

Über die Natur der Bindungen in bestrahlter Lactatdehydrogenase

von

Peter Matthias Peuten

aus

Grefrath

1976 № 395



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546221_0018

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

Über die Natur der Bindungen in bestrahlter Lactatdehydrogenase

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Peter Matthias Peuten
aus
Grefrath

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereiches Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 27. September 1976

INHALTSÜBERSICHT

<u>1. Einleitung und Problemstellung</u>	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Problemstellung	3
 <u>2. Experimenteller Teil</u>	 6
2.1. Materialien und Geräte	6
2.1.1. Materialien	6
2.1.2. Geräte	7
2.2. Methoden	8
2.2.1. Vorbereitung des Enzympräparates für die Bestrahlung	8
2.2.1.1. Allgemeines	8
2.2.1.2. Entsalzen der Enzymkristall- suspension und Einstellen des Proteingehaltes	9
2.2.2. Bestrahlung	10
2.2.2.1. Bestrahlungsanordnung	10
2.2.2.2. Dosisleistung der Röntgen- röhre und Dosis	12
2.2.3. Bestimmung der enzymatischen Aktivität	13
2.2.3.1. Prinzip	13
2.2.3.2. Ausführung und Auswertung der Meßdaten	14
2.2.4. Gelchromatographie	15
2.2.4.1. Aufbau und Versuchsanordnung	15
2.2.4.2. Vorbereitung des Dextrangels	16
2.2.4.3. Packen der Säule	16
2.2.4.4. Auftrennung der Enzymproben	16
2.2.4.4.1. Prinzip der Gel- filtration	16
2.2.4.4.2. Auswertung der Chro- matographieläufe	17
2.2.4.5. Eichung der Säule	18

2.2.5. Aufkonzentrieren der Proteinlösung	18
2.2.6. Pufferwechsel	19
2.2.7. Differenzspektrum	19
2.2.8. Aminosäurenanalyse	19
<u>3. Ergebnisse</u>	20
3.1. Bestrahlungsbedingungen	20
3.1.1. Pufferwahl	20
3.1.2. Dosisbestimmung	22
3.2. Dosis-Effekt-Kurven	22
3.3. Nachreaktion durch Einwirkung von UV-Licht	25
3.4. Auftrennung der Bestrahlungsprodukte	25
3.4.1. Verteilung der enzymatischen Aktivität im Chromatogramm	28
3.5. Vorbereitung des Enzyms für die Inkubation mit SDS	30
3.5.1. Aufkonzentrieren	30
3.5.2. Pufferwechsel	31
3.6. Gelchromatographie	33
3.6.1. Auftrennung des tetrameren Enzympeaks in Gegenwart von SDS	33
3.6.2. Verlust der enzymatischen Aktivität nach Zusatz von SDS	35
3.6.3. Gelchromatographie nach Reduzierung des bestrahlten Enzyms	37
3.6.4. Gelfiltration über G-10	39
3.7. Molekulargewichtsabschätzung der Bruchstücke	42
3.8. UV-Differenzspektrum	44
<u>4. Diskussion</u>	48
<u>5. Zusammenfassung</u>	57
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	58

1. Einleitung und Problemstellung

1. 1. Einleitung

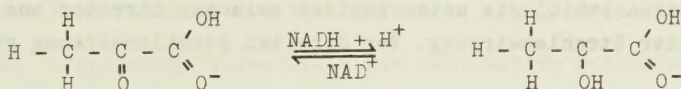
Die strahlenbiologische Forschung ist fast genauso alt wie die Entdeckung der ionisierenden Strahlen durch Röntgen 1895. Die Faszination, die Umwelt mit ihren Phänomenen zu erfassen, war wohl der bestimmende Beweggrund für diesen Forschungszweig. Heute, in einer Zeit, in der wir mit der Kerntechnik leben, ist die Erforschung strahlenbiologischer Zusammenhänge zur Notwendigkeit geworden.

Die Wirkung ionisierender Strahlen auf biologische Objekte läßt sich am besten an überschaubaren Modellen wie Proteine, DNS oder RNS studieren, da größere Objekte wie z.B. eine Zelle oder gar ein Organismus wegen ihrer vielfältigen Regelmechanismen für den derzeitigen Forschungsstand noch zu komplex sind. Man hofft durch die Aufklärung von Elementarprozessen einen Einblick in die Wirkungsweise ionisierender Strahlen auf komplexe Systeme zu gewinnen.

Enzyme erfreuen sich besonderer Beliebtheit bei den Strahlenbiologen, da man durch den Verlust der katalytischen Eigenschaften ein direktes Maß für die Strahlenwirkung hat.

Ab 1960 ist es gelungen, Proteine hochgereinigt herzustellen. Seit dieser Zeit ist es auch möglich, strahlenchemische Veränderungen an Proteinmolekülen zu beobachten.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Strahlenwirkung an dem Enzym Lactatdehydrogenase (LDH), das aus dem Skelettmuskel Kaninchen gewonnen wurde. LDH ist ein Nikotinamidadenindinukleotid (NADH_2)-abhängiges Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels, das folgende Reaktion katalysiert:



Es besteht aus vier Untereinheiten (Monomere oder Protomere genannt), die zusammen das aktive Enzym ausmachen.

Die Primärstruktur ist erst zum Teil aufgeklärt (31,32). Nach Röntgenstrukturanalysen soll die Untereinheit aus 311 Aminosäureresten bestehen und bis auf einen Rest von 20 Aminosäuren am N-terminalen Ende globulärer Struktur sein (1). Davon sollen etwa 24% auf α -Helices und 10-15% auf β -Strukturen entfallen.

Native LDH besitzt keine Disulfidbrücken. An der Außenseite befinden sich Bereiche mit polaren Gruppen, die in Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel stehen.

Von der Untereinheit existieren 2 verschiedene Typen H und M Ketten, die sich durch ihre Primärstruktur unterscheiden. Durch Kombination dieser Untereinheiten gibt es 5 verschiedene Isoenzyme, die sich elektrophoretisch auftrennen lassen:

$LDH_1 = LDH-H_4$, kommt hauptsächlich im Herzmuskel vor

$LDH_2 = LDH-H_3M_1$

$LDH_3 = LDH-H_2M_2$

$LDH_4 = LDH-H_1M_3$

$LDH_5 = LDH-M_4$, kommt hauptsächlich im Skelettmuskel vor.

Die Untereinheit hat ein MG von 36 000, das tetramere Enzym 144 000 (6,7) $LDH-M_4$, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, reagiert auf die Parameter: Temperatur, pH, Ionenstärke wesentlich empfindlicher als die anderen Typen (2,3). Bei der Elektrophorese ist es wesentlich weniger beweglich (4).

Die Strahlenbiologie unterscheidet zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung. Von direkter Strahlenwirkung spricht

man, wenn die Wirkung der Energie auf die Substanz ohne Vermittlung von Lösungsmittel geschieht. In der vorliegenden Arbeit steht die indirekte Strahlenwirkung im Vordergrund. Hierbei wird die Energie hauptsächlich vom Lösungsmittel absorbiert. Es bilden sich bei Wechselwirkung mit dem Wasser solvatisierte Elektronen, OH ·- und H ·-Radikale, die zu den Makromolekülen diffundieren und mit ihnen reagieren.

Den Wirkungsablauf ionisierender Strahlen hat man in 4 Phasen eingeteilt, die ineinander übergehen (9):

1. in der physikalischen Phase (Dauer 10^{-13} sec) wird die Strahlenenergie in den Molekülen absorbiert. Dieser Prozeß führt zur Bildung angeregter oder ionisierter Moleküle,
2. in der physiko-chemischen Phase (Dauer 10^{-10} sec) reagieren die Primärprodukte spontan miteinander oder mit Molekülen der Umgebung unter Bildung von freien Atomen oder Radikalen,
3. in der chemischen Phase (Dauer 10^{-6} sec) setzen die aktivierten Moleküle die Reaktion fort,
4. in der biologischen Phase (Dauer bis mehrere Jahre) werden die strahleninduzierten Veränderungen manifest.

1.2. Problemstellung

Denkl (4) und Kunigk (10) fanden bei der Bestrahlung von LDH zwei Effekte:

1. Einen Aktivitätsverlust des Enzyms.
2. Eine Vergrößerung eines Teils der bestrahlten Moleküle.

Der Anteil der vergrößerten Moleküle war abhängig von der verabfolgten Dosis. Die Vergrößerung deuteten sie als Aggregation oder als Entfaltung bzw. als beides. Aktivitätsverlust und Vergrößerung von Enzymmolekülen treten auch auf, wenn man die Enzyme mit Detergentien behandelt. Eichhorn (11) behandelte LDH mit dem Detergenz SDS. Er fand:

1. Einen Aktivitätsverlust, der sofort nach der Inkubation von Enzym und Detergenz auftrat.
2. Eine Entfaltung des Proteins in Abhängigkeit des Gewichtsverhältnisses von g LDH zu g SDS.
3. Eine Aufhebung der nicht kovalenten Bindungen zwischen den Untereinheiten des enzymatischen aktiven Moleküls oberhalb eines Gewichtsverhältnisses von 1,4 g SDS/g LDH

Niemczyk (12) bestrahlte LDH und untersuchte die Natur der Bindungen im strahleninduzierten Aggregat. Er konnte zeigen, daß sich im Aggregat Peptidbruchstücke befinden, die durch hydrophobe und elektrostatische Bindungen zusammengehalten werden. Durch Zusatz von SDS hob er diese Bindung auf und fand Bruchstücke mit einem MG von 15 000, 8 000 und 500. In Fortführung dieser vier Arbeiten sollten in der vorliegenden Arbeit die Bindungen in den Molekülen untersucht werden, die nach der Bestrahlung

- 1) gegenüber den Molekülen des Aggregats noch eine beträchtliche enzymatische Aktivität aufweisen,
- 2) die ihrer Größe nach gelchromatographisch dem nativen LDH entsprechen. (tetramerer Molekülpeak)

Da keine Vergrößerung der Moleküle vorkommt, könnte es sich um Moleküle handeln, bei denen nur eine strahleninduzierte Veränderung am aktiven oder allosterischen Zentrum stattgefunden hat.

Theoretisch können aber auch neue Bindungen kovalenter und nicht kovalenter Natur entstanden sein, die mit Brüchen der Peptidkette kombiniert sein konnten. Hat bei den Molekülen des tetrameren Peaks eine Änderung stattgefunden, die weitergreift als nur eine Modifizierung des aktiven oder allosterischen Zentrums, so müssen die im folgenden genannten Untersuchungsgänge positiv sein:

Liegen Enzymbruchstücke vor, die von hydrophoben oder elektrostatischen Wechselwirkungen zusammengehalten werden, so müssen sie unter den Dissoziationsbedingungen bei Behandlung mit SDS zu trennen sein.

Liegen nur Bindungen elektrostatischer Natur vor, so müßten sie mit hohen Salzkonzentrationen gelöst werden. Liegen radiolytisch gebildete Disulfidbrücken vor, müssen nach der Reduktion der bestrahlten Moleküle veränderte Moleküle vorliegen.

Eventuell entstandene C-C Bindungen an C -Radikalen sind mit den bei dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Mitteln nicht zu klären. Die wichtigste Aufgabe dieser Arbeit ist daher, festzustellen, wie sich nach den genannten Bestrahlungen mit SDS, Salz oder durch Reduktion das gelchromatographische Verhalten des Bestrahlungsproduktes ändert.

Dazu sollten zunächst die Parameter: pH, Ionenstärke, Molarität und Dosis so gewählt werden, daß im Bestrahlungsprodukt eine hinreichend hohe Ausbeute an tetrameren Molekülen erzielt wird. Es sollte überprüft werden, ob die Bestrahlungsprodukte unter diesen Bedingungen in Lösung bleiben und die Restaktivität sich nicht mehr ändert. Dosis-Effekt-Kurven von nativer und bestrahlter LDH sollten erstellt werden, ebenso sollte der Einfluß von SDS auf die enzymatische Aktivität untersucht werden.

Differenzspektren sollen von nativer und bestrahlter LDH aufgenommen werden. Ebenso sollte der Einfluß von SDS auf das Differenzspektrum untersucht werden.

Schließlich sollen Aminosäureanalysen von den Enzymproben zeigen, ob durch Bestrahlung die Zahl einzelner Aminosäuren verändert wird.

2. Experimenteller Teil

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Materialien

Folgende Materialien und Chemikalien wurden verwendet:

- Laktatdehydrogenase ⁽¹⁾, EC 1.1.1.27, aus Kaninchenmuskeln in 3,2 M Ammoniumsulfat - Kristallsuspension,
- Reduziertes Nikotinamid - adenin - dinukleotid ⁽²⁾ als di - Natriumsalz (80 %),
- Pyruvat, Natriumsalz; Boehringer und Söhne, Mannheim,
- Sephadex G-25-fine und G-200,
- Blue Dextran 2000; Pharmacia, Uppsala, Schweden,
- Myoglobin vom Pferd; Serva Entwicklungslabor, Heidelberg,
- Rinderserumalbumin ⁽³⁾, trocken, "reinst"; Behringwerke AG Marburg,
- Eialbumin; Fluka AG, Chemische Fabrik Buchs SG,
- Marinon,
- Incidin; Henkel GmbH, Düsseldorf,
- Hibitane; Imperial Chemical Industries,
- Dodecylsulfat ⁽⁴⁾, Natriumsalz, zweimal in Äthanol umkristallisiert,

Sowie alle übrigen Chemikalien; Merck, Darmstadt.

Es wurden nur entionisiertes, zweimal quarzdestilliertes Wasser verwendet.

Abkürzungen:

- (1) LDH
 - (2) NADH
 - (3) RSA
 - (4) SDS
-

2.1.2. Geräte

Folgende Geräte wurden benutzt:

- Therapie - Röntgenröhre TR 300 f; Siemens Erlangen,
- Aminosäureanalysator BC - 200; Biocal, München,
- Spektralphotometer PMQ; Carl Zeiss, Oberkochen,
- Quarz - Infrasil - und - Suprasil-Küvetten, Schichtlänge 1 cm; Hellma, Mühlheim,
- Isco - Absorptionsspektrometer Modell UA 5; Lincoln USA,
- Teleprint - Schreiber; LKB Bromma, Schweden,
- Mikropipetten Marburg; Eppendorf Gerätebau, Hamburg,
- pH-Meter 27; Radiometer, Kopenhagen,
- Elektrische Magnetührgeräte JKA - Combimag; Janke und Kunkel, Staufen,
- Chromatographieröhre aus Plexiglas; nach Plan angefertigt von Herrn Lehmeier, Institut für Physikalische und Medizinische Strahlenkunde, Erlangen,
- Einhängethermostat Thermomix II; Braun Apparatebau, Mellungen,

- YSI - Modell 42 SC Telethermometer; Yellow Springs, Ohio, USA,
- Universal - Impedanzbrücke 1650; General Radio, Massachusetts, USA,
- Ultro Rac-Fraktionensammler LKB 7000; LKB Produkter, Bromma, Schweden,
- Colora Kühltruhe für Ultro Rac LKB 7000, Colora Meßtechnik, Lorch, Württemberg,
- Optilab Printer Driver 833,
- Optilab-Analog-Digital-Wandler Multilog 801,
- Optilab Präzisions Timer 825; Optilab und Bo Philip, Instrumentation AB Vällingby, Schweden,
- Calculator 9100 A; Hewlett Packard, Loveland, Colorado, USA,
- Kälte-Thermostat Ultra Kryomat TK 30; Wobsa, Lauda.

2.2. Methoden

2.2.1. Vorbereitung des Enzympräparates für die Bestrahlung

2.2.1.1. Allgemeines

Die Versuche wurden unter sterilen Kautelen durchgeführt. Gefäße, Pipetten, Schläuche und Magnetprüher wurden mit 70%igem Propanol desinfiziert.

Die Chromatographiesäulen wurden vor jeder Füllung mit Laborreiniger RBS 50 gereinigt, mit 2% Marinon und 70%igem Propanol desinfiziert, anschließend wurden sie mit aqua dest. gespült und sofort mit Gel gepackt.

Die Gelsuspension und alle Puffer wurden bei 120° C 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert. Um das Wachstum eventuell vorhandener Bakterien zu hemmen, wurden die Säulen in den Benutzungspausen mit einem Bakteriostaticum (0,02% Hibitane oder 0,2% Na-Azid) eluiert. Des weiteren wurde der Chro-

matographieraum mit UV-Licht ausgeleuchtet und von Zeit zu Zeit mit dem bakterizid wirkenden Incidin gereinigt.

2.2.1.2. Entsalzen der Enzymkristallsuspension und Einstellen des Proteingehaltes

Das Enzympräparat lag als Kristallsuspension in einer 3,2 M Ammoniumsulfatlösung in der Konzentration 10mg/ml vor. Zum Bestrahlen mußte das Enzym in 0,1 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,0 überführt werden. Dies geschah mit einer Sephadex G-25 fine gefüllten Säule (45 x 1,4 cm). Es wurden jeweils 3ml Enzymlösung, die mit 3ml Puffer verdünnt waren, aufgetragen. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 3ml (= 45 Tropfen) aufgefangen. Die Fraktionen 9 - 12 ($E_{280} > 3$) enthielten das meiste Protein. Ammoniumsulfat konnte ab Frak. 15 mit Neßlers Reagenz nachgewiesen werden. Die ammoniumsulfatfreien Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden zusammengeschüttet, auf die gewünschte Enzymkonzentration eingestellt und bis zur Bestrahlung, die sich meist sofort anschloß, bei 4° C aufbewahrt.

Die Proteineinstellung auf 1mg/ml geschah mit Hilfe des Spektrometers. Nach dem Lambert - Beer'schem Gesetz gilt:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d \rightarrow c = \frac{E}{\epsilon \cdot d}$$

E = die gemessene Extinktion

ϵ = der Extinktionskoeffizient ($\frac{\text{ml}}{\text{mg} \cdot \text{cm}}$)

c = die Konzentration der Lösung ($\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$)

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

Da das Enzympräparat zu 95% aus dem Isoenzym M_4 besteht (4,17), konnte für die Berechnung der Enzymkonzentration

der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280} = 1,44 \frac{\text{ml}}{\text{mg} \cdot \text{cm}}$ zu Grunde gelegt werden. Dieser Extinktionskoeffizient gilt für eine 0,1%ige LDH-M₄ Lösung unter Standardbedingungen (6,7).

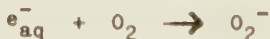
2.2.2. Bestrahlung

2.2.2.1. Bestrahlungsbedingungen

Bestrahlt wurden jeweils 10ml der Lösung. Dazu befand sich die Lösung in einem Quarztopf s. Abb. 1. Die 10ml machten ungefähr eine Schichtdicke von 1 cm aus. Oberhalb des Flüssigkeitsspiegels besaß der Topf seitlich zwei Öffnungen: eine für die Zuleitung des Schutzgases und eine für die Probenentnahme. Nach oben zur Röhre hin wurde das Töpfchen mit einer 0,03 mm dicken Hostaphanfolie abgedeckt. Der Quarztopf war mit einem Kühlmantel versehen und in einem Plexiglasblock eingelassen. Das Kühlwasser und der 5 cm starke Plexiglasboden schützten vor einer Rückstreuung der Röntgenstrahlen an dem Magnetrührer, auf dem das Bestrahlungsgefäß stand.

Der Sauerstoff der Proteinlösung wurde durch wassergesättigten Stickstoff verdrängt. Der Stickstoff wurde 2 Stunden vor der Bestrahlung und während der Bestrahlung über die Probe geleitet. Zusätzlich wurde die Lösung noch mit einem teflonbeschichteten Magnetrührer während der ganzen Zeit langsam gerührt.

Der Sauerstoffgehalt der Lösung betrug bei Beginn der Bestrahlung weniger als $5 \cdot 10^{-5} \text{ M O}_2$, während die Lösung unter Luft $3 \cdot 10^{-3} \text{ M O}_2$ enthält. Die Verdrängung des Sauerstoffes ist wichtig da Sauerstoff Radikale wegfangen kann, die das Enzym inaktivieren können. Sauerstoff reagiert besonders schnell mit hydratisierten Elektronen:



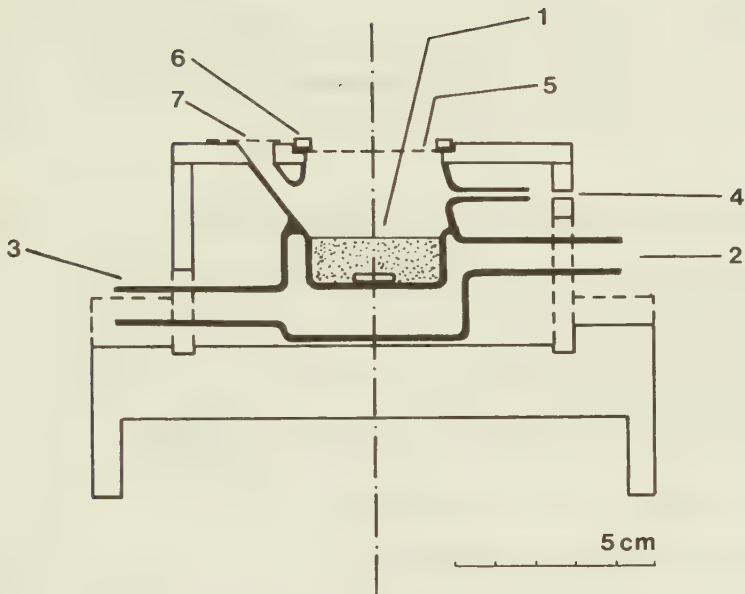


Abb.:1 Bestrahlungsgefäß

- 1) Quarztöpfchen mit Probe
- 2) Kühlwasserzuleitung
- 3) Kühlwasserableitung
- 4) Schutzgaszuleitung
- 5) Hostaphanfolie
- 6) Dichtungsring
- 7) Probeentnahmeöffnung

Das entstandene Sauerstoffion ist recht beständig und reagiert kaum mit Proteinen.

Bestrahlt wurde bei 2° - 1° C; eine thermische Denaturierung wurde somit ausgeschlossen. Während der Bestrahlung wurden alle 15 Minuten mit Mikropipetten 50ml Lösung gegen den Strom des Schutzgases entnommen.

2.2.2.2. Dosisleistung der Röntgenröhre und Dosis

Bestrahlt wurde mit einer Röntgenröhre Stabilipan 300 der Firma Siemens. Die Röhrenspannung betrug 200 kV, der Röhrenstrom 20 mA bei einer Eigenfilterung von 2 mm Aluminium. Der Abstand vom Fokus der Röhre zur Oberfläche der Lösung betrug 124 mm.

Die Dosisleistung wurde auf zweierlei Weise bestimmt:

- 1) physikalisch (Ionisationskammer)
- 2) chemisch (Fricke - Dosimetrie)

Beide Verfahren ergaben eine Dosisleistung von 2490rd/min.

Bestrahlt wurde 80 Minuten.

Das ergab eine Dosis von 197 krd.

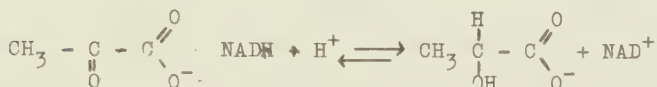
-
- 1) Die physikalische Dosisleistungsbestimmung wurde dankenswerter Weise von Herrn Dr. P. Milbers und Herrn Dr. Th. Schmidt durchgeführt.
 - 2) Die chemische Bestimmung verdanken wir Frau Dr. H. Schußler.

2.2.3. Bestimmung der enzymatischen Aktivität

2.2.3.1. Prinzip

Zur Messung der enzymatischen Aktivität der LDH dient der von O. Warburg 1936 eingeführte optische Test (18, 19).

LDH katalysiert folgende Reaktion:



$$\frac{[\text{Lactat}] \cdot [\text{NAD}^+]}{[\text{Pyruvat}] \cdot [\text{NADH}] \cdot [\text{H}^+]} = 3,6 \cdot 10^{11}$$

Das Gleichgewicht liegt unter Normbedingungen mit einer Konstante von $3,6 \cdot 10^{11}$ auf der Seite des Lactats.

Die Oxydation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ läßt sich photometrisch verfolgen, während NAD^+ nicht absorbiert. Da es sich um eine stöchiometrische Reaktion handelt, entspricht der Verbrauch von Cosubstrat ($\text{NADH} + \text{H}^+$) genau dem Verbrauch an Substrat (Pyruvat).

Die Enzymaktivität wird in internationalen Einheiten gemessen. 1 IU ist die Aktivität, welche 1 Mol Substrat pro Minute bei 25°C umsetzt. Die spezifische Aktivität ist die Enzymaktivität bezogen auf mg Enzymprotein:

$$\text{IU/mg} = \frac{\Delta E \cdot V}{\Delta t \cdot \epsilon_{\text{NADH}} \cdot d \cdot v \cdot c_{\text{prot}}} \left[\frac{\text{Mol}}{\text{min mg}} \right]$$

- ϵ_{NADH} = Extinktionskoeffizient von NADH; bei 340 nm beträgt 6,22 (cm^2/Mol)
- ΔE = Extinktionsänderung
- t = Meßzeitintervall (min.)
- V = Testvolumen
- v = Probevolumen (cm^3)
- $c_{\text{prot.}}$ = Konzentration des Enzyms ($\frac{\text{mg}}{\text{cm}^3}$)

Aus dieser Formel ersieht man, daß die Anfangsgeschwindigkeit $v_0 = \frac{E}{t}$ ein Maß für die katalytischen Eigenschaften eines Enzyms darstellt. Bei entsprechender Enzymverdünnung bleibt $\frac{E}{t}$ über 2 - 3 Minuten hinweg konstant.

2.2.3.2. Durchführung und Auswertung der Meßdaten

Die Meßküvette enthielt folgenden Testansatz:

- 3,00 ml M/15 Na - Phosphatpuffer pH 7,4
- 0,05 ml $\text{NADH} + \text{H}^+$ (7,1 mg/ml gelöst in 1% NaHCO_3)
- 0,05 ml Enzymlösung
- 0,05 Pyruvat (8,6 mg/ml gelöst in Aqua bidest)

Gestartet wurde die Reaktion mit Pyruvat. Die Enzymverdünnung wurde so gewählt, daß $\frac{E}{t}$ über längere Zeit konstant blieb.

Beim Erstellen einer Eichkurve befanden sich in der Küvette 0,1 - 2 μg natives LDH, bei der Erstellung der Dosis-Effekt-Kurve befand sich 1 μg in der Küvette. Die Extinktion wurde alle 3 Sekunden vom Optilab abgelesen und vom Teleprint auf Lochstreifen registriert.

Durch das mathematische Verfahren der linearen Regression ermittelte ein Rechner $\frac{E}{t}$ (1).

Als 100% Aktivität (Aktivität des nativen Enzyms) wurde mit Hilfe der Eichkurve ein Wert von 540 IU/mg ermittelt. Dies stimmt gut mit den Angaben des Herstellers überein,

der als spezifische Aktivität 550 IU/mg angibt.

2.2.4. Gelchromatographie

2.2.4.1. Aufbau der Versuchsanordnung

Für die verschiedenen Trennungen der Enzymproben wurden 4 Säulen benötigt:

1. zwei Säulen gefüllt mit G-200 in den Abmessungen von 194 x 1,4 cm zur Auftrennung der bestrahlten Proben und zur Auftrennung der mit SDS inkubierten Proben
2. eine Säule gefüllt mit G-75 in den Abmessungen von 90 x 1,4 cm zum Pufferwechsel
3. eine Säule gefüllt mit G-10 in den Abmessungen von 140 x 1,4 zur Auftrennung der reduzierten Proben.

Um die Chromatographieröhren befanden sich Kühlmäntel aus Plexiglas. Die Säulen wurden mit 2 Hartplastikstempeln verschlossen. Polyacrylamidsiebe (Porengröße 28μ) verhinderten ein Eindringen von Gel in die zuführenden Schläuche.

Nähere Angaben über den Bau der Chromatographiesäulen finden sich in der Dissertation von Kunigk (10).

Die Säulen wurden mit dem jeweils benötigten Puffer äquilibriert. Über das Pufferreservoir wurde Stickstoff geleitet, um ein Wachstum aerober Keime zu verhindern.

-
- (1) Die mathematische Auswertung der Daten verdanken wir Herrn Prof. W. Schüßler und Herrn Dipl. Ing. H. Oetken vom Institut für Nachrichtentechnik an der hiesigen Universität.

2.2.4.2. Vorbereitung der Dextrangele

Hohe und gleichmäßige Durchflußraten bedingen eine sorgfältige Vorbereitung des Gels, dies gilt besonders für das weiche Gel G-200. Eine genügende Menge Gels wurde in Wasser aufgeschwemmt und nach 10 Minuten wurde der Wasserüberstand mit den nicht abgesetzten Gelpartikeln abgesaugt. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, bis die bei Determann (20) angegebenen Quellzeiten erreicht waren. Danach wurde das Gel 20 Min. bei 120° C autoklaviert.

2.2.4.3. Packen der Säule

Die Säule wurde unten mit dem Stempel verschlossen und der Zuleitungsschlauch wurde abgeklemmt. Nachdem die Arbeitsgänge zur Sterilisierung durchgeführt waren (siehe Absatz: 2.2.1.1.) wurde das Gel mit einer Spritze aufgetragen, wobei zu beachten war, daß sich keine Luftblasen bildeten. Nach der Füllung diente ein Trichter, der auf die Säule gesetzt wurde als Reservoir für Gel und Puffer. Mit einer Druckdifferenz von 15 cm Puffersäule wurde die Säule 2 Tage von oben nach unten eluiert. Das Gel setzte sich so ab. Die Säule wurde dann verschlossen und von unten nach oben mit dem gleichen Druck eluiert. Hob sich das Gelbett von der Unterlage ab, so wurde der Stempel nachgeführt oder Gel nachgepackt. Nach 2 - 3 Tagen war dies jedoch nicht mehr der Fall, die Säule war betriebsbereit.

2.2.4.4. Auftrennung der Enzymproben

2.2.4.4.1. Prinzip der Gelfiltration

Sephadex Gele sind modifizierte Dextrane mit hydrophilem Charakter. Das gequollene Gel stellt ein Netzwerk mit

verschieden großen Zwischenräumen dar. Während kleine Moleküle sich im gesamten Wasser verteilen, können große in entsprechend kleine Zwischenräume nicht eindringen. Sie verteilen sich also nur in einem Teil des Gesamtwassers. Man spricht deshalb auch von einem "Ausschlußeffect". Dies hat zur Folge, daß große Moleküle schneller die Säule verlassen als kleine. Zwischen dem Molekulargewicht reduzierter globulärer Proteine und ihrem relativen Elutionsvolumen V_e/V_o besteht eine Beziehung, die zur Molekulargewichtsbestimmung herangezogen werden kann.

V_e bezeichnet das Elutionsvolumen einer Substanz, gemessen vom Aufbringen der Substanz auf die Säule bis zur Elution in maximaler Konzentration.

V_o ist identisch mit dem Elutionsvolumen einer vom Gel vollständig ausgeschlossenen Substanz.

2.2.4.4.2. Durchführung der Chromatographieläufe

Die bestrahlten Proben wurden über G-200 eluiert; die Säule war mit dem entsprechenden Puffer äquilibriert. Die bestrahlten Proben wurden bis zur Auftragung eine Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen; dies erwies sich als günstig, weil beim Auftragen sofort nach der Bestahlung durch die Erwärmung der Lösung sich Gasblasen in den zuführenden Schläuchen bildeten, wodurch die Elutionsgeschwindigkeit gemindert wurde.

Das Eluat wurde in Fraktion zu 3ml aufgefangen und gekühlt. Durch den Zusatz von SDS zum Puffer verringert sich die Oberflächenspannung und damit das Volumen eines Tropfens. Um jeweils Fraktionen von 3ml zu erhalten mußte folgende Tropfenzahl pro Fraktion eingestellt werden:

Puffer	Tropfenzahl
0,1 M Na - Phosphat	45
0,1 M Na - Phosphat, 1 M NaCl	45

0,05 M Ammoniumsulfat,	0,5 M Essigsäure	45
0,01 M Na - Phosphat	0,6 m M SDS	60
0,01 M Na - Phosphat	2 m M SDS	75

Die Extinktion der einzelnen Fraktionen wurde bei $\lambda = 280\text{nm}$ gegenüber Puffer gemessen.

2.2.4.5. Eichung der Säule

Die Abschätzung des Molekulargewichtes (MG) der durch Bestrahlung und Inkubation von SDS veränderten Moleküle geschah nach dem von Whitaker (21) angegebenen linearen Zusammenhang zwischen dem relativen Elutionsvolumen (s. Abs. 2.2.3.1.) und dem Logarithmus des Molekulargewichts reduzierter globulärer Proteine.

Als Eichsubstanz dienen nach Determann (20) folgende Standardsubstanzen:

1. Rinderserumalbumin RSA (Monomer MG 67 000
Dimer MG 134 000)
2. Eialbumin (MG 45 000)
3. Myoglobin von Pferd (MG 17 000)

RSA und Eialbumin wurden vor dem Auftragen auf die Säule 2 Stunden mit 1% Mercaptoäthanol bei 37°C im Wasserbad reduziert. Vo wurde mit Blue Dextran 2000 (MG 2×10^6) bestimmt.

2.2.5. Aufkonzentrieren der Proteinlösung

Bei sehr großen Verdünnungen, z.B. LDH Gehalt $< 100 \mu\text{g/ml}$ bei 0,01 M Natriumphosphatpuffer kommt es nach Jaenicke (22) zur Verdünnungsdenaturierung.

Nach dem Auftrennen über Sephadex G-200 verringerte sich die Enzymkonzentration auf ungefähr $250 \mu\text{g/ml}$. Da bei weiteren Chromatographieläufen eine weitere Verdünnung auftrat, wurde

die Enzymlösung nach der Elution über G-200 aufkonzentriert. Dies geschah nach einem von Determann angegebenen Verfahren:

3 g G-25 coarse wurde in eine Fritte gegeben, deren Boden durch ein Blatt Filterpapier abgedeckt wurde. Dazu wurden 12 ml Proteinlösung pipettiert. 15 Minuten ließ man das Gel quellen, sodann wurde bei 3000 U/min 20 Minuten lang zentrifugiert. Da die Proteinmoleküle nicht in das Gel eindringen, werden sie abzentrifugiert. Ein Teil des Lösungsmittels bleibt dagegen im Gel. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten genügend hohe Enzymkonzentrationen erreicht werden.

2.2.6. Pufferwechsel

Da für die Einwirkung von SDS auf das Protein ein Puffer geringerer Ionenstärke als der Bestrahlungspuffer benötigt wurde, mußte die Enzymlösung vor der Inkubation mit SDS von einem 0,1 M Na - Phosphatpuffer in einem 0,01 M Na - Phosphatpuffer überführt werden.

2.2.7. Differenzspektrum

Bei der Aufnahme der Differenzspektren wurden die bestrahlten und mit SDS inkubierten Enzymlösungen gegen native LDH gleicher Konzentration im Bereich von $\lambda = 236 - 320$ nm gemessen. Differenzspektren wurden aufgezeichnet von der gesamten bestrahlten Lösung, als auch von den Fraktionen nach gelchromatographischer Auftrennung.

2.2.8. Aminosäurenanalyse

Die zu untersuchenden Enzymfraktionen wurden in den flüchtigen 0,05 M Ammoniumacetatlösung und 0,2 M Essigsäure

überführt. Dies geschah mit einer Sephadex G-10 Säule (140 x 1,4 cm). Durch dreimaliges Gefrier-trocknen wurde dieser Puffer entfernt.

Sodann wurden die Enzymproben in evakuierten Glasampullen (2×10^{-2} Torr) mit 6 N HCl 24 Stunden bei 110° C hydrolysiert. Die Proben wurden im Rotationsverdampfer eingengt und mehrmals in Aqua dest aufgenommen und wieder eingengt. So konnte ein großer Teil der HCl entfernt werden.

Die Analyse (¹) erfolgte nach der Methode von Spackmann, Stein und Moore (23) in einem automatischen Aminosäure-analysator.

Durch die verschiedenen Behandlungsverfahren wurden die Mengen an Proben so klein, daß mehrere Chromatographieläufe kein reproduzierbares Ergebnis erbrachten.

3. Ergebnisse

3.1. Bestrahlungsbedingungen

3.1.1. Pufferwahl

Der Puffer ist ein wichtiger Parameter für die Stabilität des Enzyms. So bestrahlte Denkl (4) LDH in einem 0,01 M N - Phosphatpuffer pH 7,2 mit einem Zusatz von NaCl und erzielte eine geringere Aggregationsbeute als Kunigk (10), der einen 0,067 M Kaliumphosphat- / Na - Phosphatpuffer bei sonst gleichen Bedingungen verwendete. Ein kaliumhaltiger Puffer konnte für die vorliegende Arbeit nicht benutzt werden, da das Kalium - SDS unlöslich ist (24). Um die gleichen Bedingungen wie Niemczyk zu erhalten, wurde in 0,1 M Na - Phosphatpuffer

¹) Die Analyse führte in dankenswerter Weise Frau Dr. H. Schüssler u. Frä. Herget durch.

pH 7,0 bestrahlt. In diesem Puffer traten weder am nativen noch am bestrahlten Enzym über längere Zeit Veränderungen auf und alle Bestrahlungsprodukte blieben in Lösung. Die Geschwindigkeitskonstante ist bei den Bedingungen für die Reaktion: (25)



Die Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktionen des OH- und H- Radikals mit Phosphat bei pH 7,0 sind kleiner als die des solvatisierten Elektrons.

In dieser Arbeit sollte auch die Einwirkung von SDS auf bestrahlte LDH untersucht werden. Nach Arbeiten von Tanford et al (26, 27, 28, 29) kann SDS in wässriger Lösung in monomerer Form oder als Micellenaggregat vorliegen. Die monomere Form des SDS vermag mit Proteinen Micellen zu bilden. Ob SDS in monomerer Form oder als Aggregat vorliegt, hängt von der SDS-Konzentration, der Ionenstärke und der Temperatur der Lösung ab. Als kritische Micellarkonzentration (MCM) bezeichnet man die größtmögliche monomere SDS-Konzentration in einem Puffersystem. Diese kritische MCM steigt mit abnehmbarer Ionenstärke und mit zunehmbarer Temperatur.

Bei dem Bestrahlungspuffer von 0,1 M Na - Phosphat und der Bedingung der Gelchromatographie von 4° C konnte nur eine MCM von 6×10^{-4} M SDS erreicht werden. Diese genügte nicht für die geplanten Versuche.

In 0,01 M Na - Phosphatpuffer pH 7,0 I=0,02 beträgt die kritische MCM 4×10^{-3} M SDS (7,26).

In diesem Puffer werden bei einer vorgegebenen Enzymkonzentration von 0,4mg/ml in einer 2×10^{-3} M SDS Lösung die Bedingungen von 1,4g SDS : 1g LDH erreicht, ohne die kritische MCM zu überschreiten.

Aus diesen Gründen wurde vor der Inkubation mit SDS ein Pufferwechsel nach 0,01 M Na - Phosphatpuffer durchgeführt.

3.1.2. Wahl der Dosis

Um einen Vergleich mit der Arbeit von Niemczyk zu erhalten, wurde die Dosis so gewählt, daß die gleiche Restaktivität von ungefähr 20% am Ende der Bestrahlung vorhanden war. Bei einer Dosis von 200 krd konnte diese Bedingung erfüllt werden.

Unter den in 3.1.1. und 3.1.2. genannten Bedingungen blieb das bestrahlte Enzym in Lösung, lediglich eine leichte Opaleszenz trat ein.

3.2. Dosis-Effekt-Kurven

Die Strahlenempfindlichkeit der LDH wurde unter weitgehend anaeroben Bedingungen untersucht.

Abb. 2 zeigt die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität einer LDH-Lösung von der Dosis. Bei einer Dosis von 200 krd sank die Enzymaktivität auf 19% des Ausgangswertes ab. Man erkennt den exponentiellen Abfall der LDH Aktivität mit zunehmender Dosis.

Durch die Verwendung des Optilabsystems und der Registrierung durch Teleprint und anschließender mathematischer Auswertung der für die enzymatische Funktion wichtigen Anfangsgeschwindigkeit V_0 (s. Abs. 2.2.3.1.) konnten die Fehler in engeren Grenzen gehalten werden als die in früheren Arbeiten.

Die einzelnen Meßpunkte lagen mit einer Korrelation von über 99% auf der Geraden, die ein Maß für V_0 darstellt. Die Werte von 50, 100, 150, 200 krd lagen mit einer Korrelation $> 98\%$ auf der Geraden der Dosis-Effekt-Kurve.

Der Mittelwert der Inaktivierungsdosis D_{37} betrug 112 krd bei einer Streuung von 6 krd.

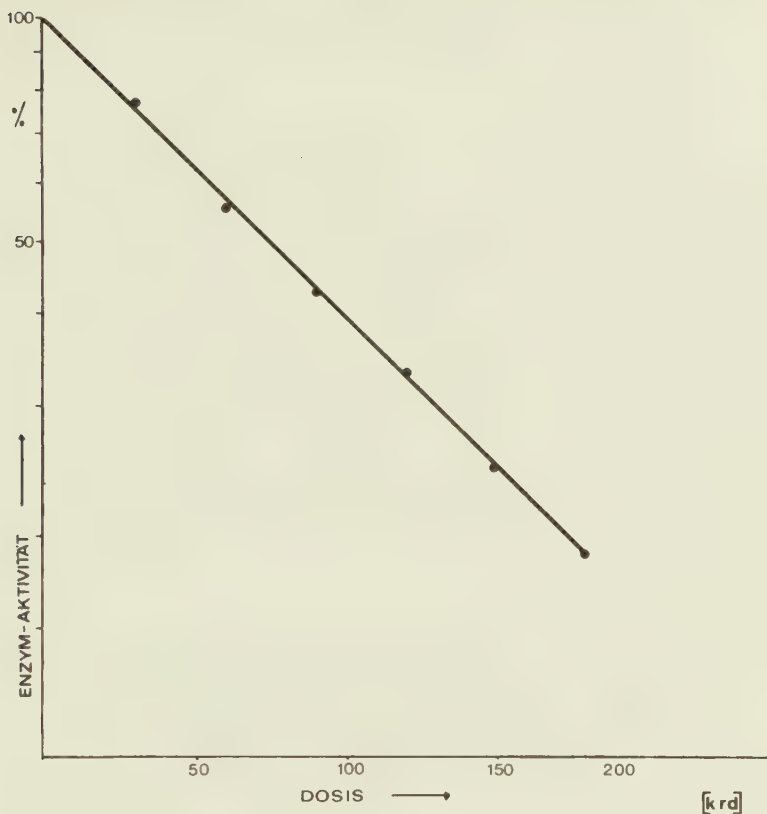


Abb.:2 Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der LDH-M₄ von der Dosis in % der Rest-Aktivität.

Mittelwerte aus 5 Versuchen.

Proteinkonzentration: $1 \pm 0,3$ mg/ml

Puffer: 0,1 M Na - Phosphat

pH 7,0

Mit der verabreichten Dosis stieg auch die Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ wie Abb. 3 zeigt.

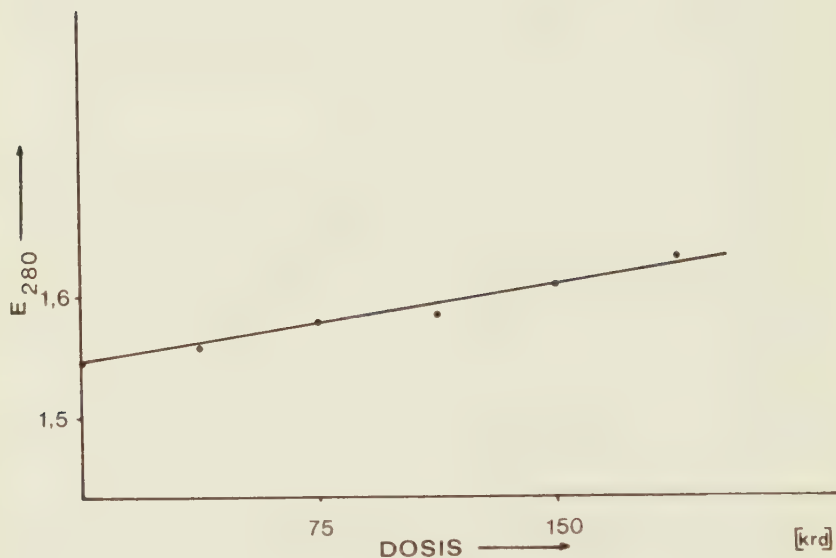


Abb.:3 Abhängigkeit der Extinktion bestrahlter LDH-Lösung von der Dosis
 Proteinkonzentration: 1mg/ml
 Puffer: 0,1 M Na - Phosphat
 Gemessen wurde eine Extinktionsänderung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$.

- 25 -

Der spezifische Extinktionskoeffizient steigt von $1,44 \text{ ml/mg cm}$ bei nativer LDH auf $1,54 \text{ ml/mg cm}$ an. Ursache dürfte eine stärkere Entfaltung und Aggregation sein, die zu einer Streuung des Lichtes führt

3.3. Nachreaktion durch Einwirkung von UV-Licht

Stellte man die bestrahlten Proben in den Kühlschrank, trat keine weitere Änderung der Extinktion und der enzymatischen Aktivität über 14 Tage auf.

Setzte man sie jedoch UV- Licht aus, wie es für die Bestimmung der Proteinkonzentration geschieht, so kam es zu einer Nachreaktion. Abb. 4 zeigt eine Abhängigkeit bestrahlter LDH von UV-Licht verschiedener Wellenlänge im Gegensatz zum Verhalten nativer LDH.

Während UV-Licht keine Veränderung an nativer LDH bewirkt, nimmt die Extinktion bei LDH, die mit 200 krd bestrahlt wurde, im UV Bereich weiter zu.

3.4. Auftrennung der Bestrahlungsprodukte

Die bestrahlten Enzymlösungen wurden über Sephadex G-200 (195 x 1,4 cm) chromatographiert. Wie Abb. 5 zeigt, können 3 Gruppen von Teilchen unterschieden werden. Die Bezeichnungen der verschiedenen Peaks lehnen sich den Arbeiten von Denkl, Kunigk und Niemczyk an.

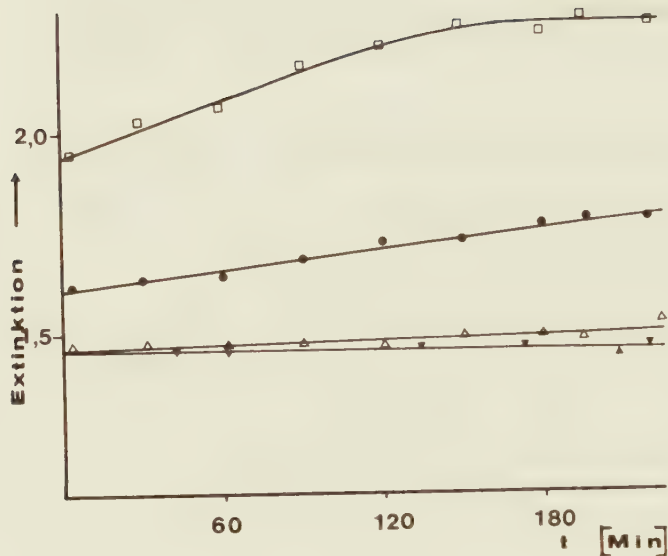


Abb.:4 Veränderung der Extinktion nativer und bestrahlter LDH durch UV-Licht.

□ : bestrahlt $\lambda = 236 \text{ nm}$

● : bestrahlt $\lambda = 280 \text{ nm}$

△ : nativ $\lambda = 236 \text{ nm}$

▲ : nativ $\lambda = 280 \text{ nm}$

Proteinkonzentration: 1mg/ml

Puffer: 0,1 M Na - Phosphatpuffer pH 7,0

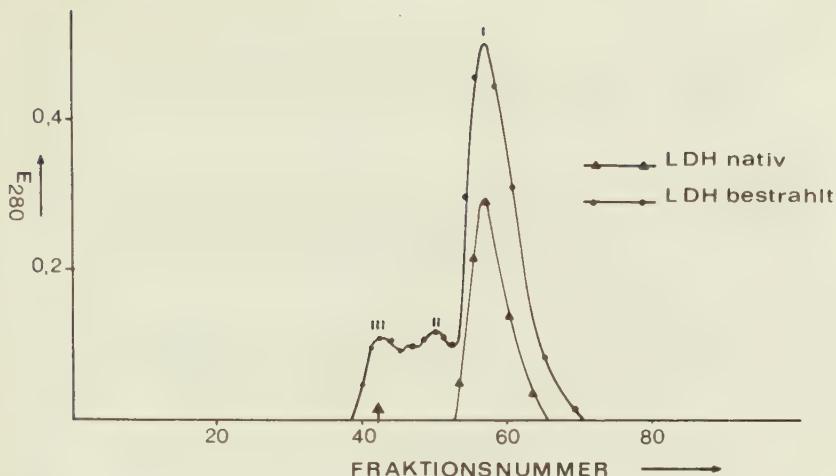


Abb.:5 Elutionsdiagramm nativer und mit 200 krd bestrahlter LDH über G-200

-▲-▲-▲- native LDH

-●-●-●- bestrahlte LDH

Proteinkonzentration: 1mg/ml

Elutionspuffer: 0,1 M Na-Phosphat pH 7,0

Der Pfeil $\uparrow$ markiert das Ausschlußvolumen V_o

III : Fraktion 38 - 44

Teilchen mit mehrfachem Molekülvolumen von nativer LDH. Es handelt sich um aggregierte und entfaltete Moleküle (12).

Restaktivität 10%

II : Fraktion 45 - 54

Teilchen mit dem 2-3fachen Molekülvolumen von nativer LDH. Es handelt sich um entfaltete Moleküle und kleinere Aggregate.

Restaktivität 10%

I : Fraktion 55 - 66

Teilchen, die die Größe des Molekylvolumens von nativer LDH behalten haben.

Restaktivität $\sim 29\%$

Niemczyk und auch Denkl (siehe hierzu 3.1.1.) fanden noch einen vierten Peak, der enzymatisch nicht mehr aktiv war und dessen Teilchengröße kleiner war, als die von nativer LDH.

In dieser Arbeit konnte er nur dann identifiziert werden, wenn durch höhere Dosis oder geringere Pufferstärke der Anteil der aggregierten Teilchen von Peak III größer war als der Anteil von Peak I.

Die Gelfiltration von nativem Enzym diente in diesem Zusammenhang als Vergleichschromatogramm. Der Peak I, der im folgenden auch tetramerer Peak genannt wird, sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden. Deshalb wurden die Fraktionen 55 - 66 vereinigt und weiter untersucht.

3.5. Verteilung der enzymatischen Aktivität im Chromatogramm

Abb. 6 zeigt die spezifische Aktivität in % der Restaktivität des Elutionschromatogramms der Abb. 5. Als 100% Aktivität wurde die spezifische Aktivität von nativer LDH eingesetzt, die außer der Bestrahlung den gleichen Bedingungen ausgesetzt war (z.B. Gelchromatographie über G-200).

Der Abfall der enzymatischen Aktivität des tetrameren Peaks auf 29% deutet darauf hin, daß am Enzym durch die Bestrahlung eine weitgehende Veränderung eingetreten sein muß.

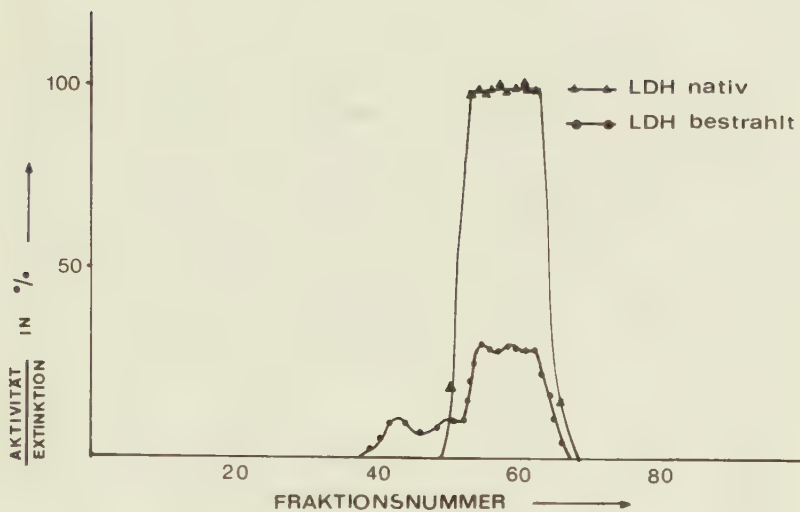


Abb.: 6 Verteilung der enzymatischen Aktivität gemäß des Chromatogrammes aus Abb. 5.
Zum Vergleich wurde die Aktivität des Peaks der nativen LDH aus Abb. 5 mitaufgezeichnet.

3.5. Vorbereitung der Enzymlösung zur Inkubation mit SDS

3.5.1. Aufkonzentrierung

Als nächster Schritt sollte das Verhalten der Moleküle nach Zusatz von SDS untersucht werden. Da die Fraktionen 55 - 66 eine mittlere Enzymkonzentration von nur 250 µg/ml besaßen, wurden sie aufkonzentriert nach dem in Abs. 2.2.5. angegebenen Verfahren.

Sichergestellt wurde, daß sich keine Veränderungen der Parameter pH, Ionenstärke und spez. Aktivität ergaben. Drei Probeversuche ergaben folgende Resultate:

	Aufkonzentrierung	
	vorher	nachher
pH	7,0	7,1
Widerstand[Ω]	120	90
E ₂₈₀	0,19-0,23	0,5-0,6
spezif. Aktivität IU	155	149
Volumen[ml]	12	4,5

Die Erniedrigung des Widerstandes bedeutet, daß in der Proteinlösung nach dem Zentrifugieren mehr Salz enthalten ist. Die Proteinmoleküle binden Salz und nehmen es beim Zentrifugieren mit. Am Dextran bleibt in der Hauptsache Wasser gebunden. Als kleines Molekül ist ein Teil Salz mit dem Wasser in Dextrangel verblieben. Die Erhöhung der Ionenkonzentration beeinflusst den Gang der Experimente aber nicht, da vor weiteren Arbeitsschritten das Enzym in 0,01 M Na - Phosphatpuffer überführt wurde.

3.5.2. Pufferwechsel

Da sich, wie in Abs. 3.1.1. beschrieben, in 0,1 M Na - Phosphatpuffer nicht genügend freies SDS lösen ließ, wurde ein Pufferwechsel des tetrameren Elutionspeak in 0,01 M Na - Phosphatpuffer vorgenommen.

Der Pufferwechsel verlief nicht ohne Komplikationen. Wie in Abb. 7a zu sehen ist, blieb das bestrahlte Enzym in 0,01 M Na - Phosphatpuffer nur ca 150 min stabil. Es galt also eine Säule so zu dimensionieren, daß folgende 2 Bedingungen erfüllt wurden:

1. der Pufferwechsel mußte binnen 2 Stunden stattgefunden haben
2. der Enzympeak mußte von Salzpeak getrennt werden.

Eine Sephadex Säule G-75 (90 x 1,4 cm) erfüllte wie Abb. 7 b,c zeigt, diese Bedingungen.

Anschließend wurde das Enzym mit SDS im Verhältnis:

0,2g SDS/1g LDH bzw

1,4g SDS/1g LDH inkubiert.

SDS wirkte sich stabilisierend auf die Löslichkeit von LDH (30) aus.

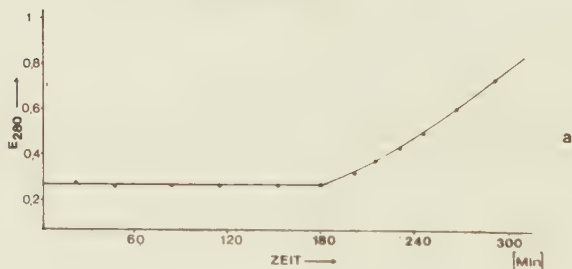
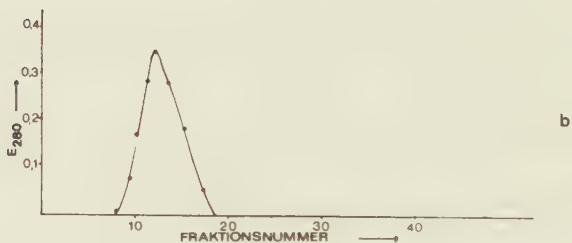
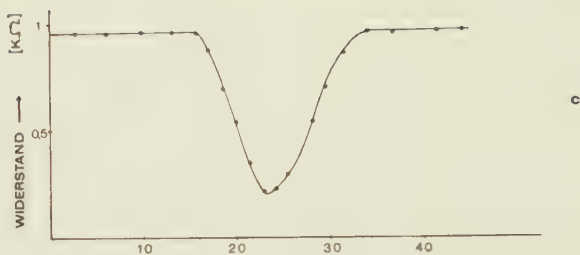


Abb.: 7 a) zeitliche Abhängigkeit der Stabilität des tetrameren Peaks aus Abb. 5 nach Pufferwechsel gemessen als Extinktionsveränderung
 b) Elutionsverhalten des Enzyms beim Pufferwechsel
 c) Elutionsverhalten des Salzes beim Pufferwechsel. Aufgetragen wurden 12ml Enzymlösung: 0,1 M Phosphat pH 7,0
 Elutionsmittel: 0,01 M Na Phosphat pH 7,0

3.6. Gelchromatographie

3.6.1. Auftrennung des tetrameren Enzympeaks in Gegenwart von SDS

Das Detergenz SDS vermag Bindungen nicht kovalenter Art abzuschwächen oder gar aufzuheben.

Abb. 8 zeigt die Elutionsdiagramme des tetrameren Enzympeaks in Gegenwart von 2 verschiedenen Konzentrationen von SDS. Die Konzentrationsverhältnisse wurden aus der Arbeit von Eichhorn entnommen.

Zusätzlich wurden zum Vergleich die Ergebnisse von Eichhorn, der die Einwirkung von SDS auf natives LDH untersuchte, mit aufgetragen. Abb. 8a zeigt das Elutionsverhalten bei einem Inkubationsverhältnis von 0,2g SDS/g LDH. Unter diesen Bedingungen fand Eichhorn bei nativer LDH eine Entfaltung des tetrameren Enzyms. Das entfaltete tetramere native Enzym wandert bei der Gelchromatographie bis kurz hinter das Ausschlußvolumen.

Der bestrahlte tetramere Peak wandert aber unter den gleichen Bedingungen nur wenig weiter zum Ausschlußvolumen V_0 . Das Maximum liegt bei der Fraktion 51. Bestrahlte LDH des tetrameren Peaks kann sich also nicht so weit entfalten wie native. Dies kann daran liegen, daß bestrahltes LDH weniger SDS zu binden vermag oder es werden bei der Bestrahlung neue Bindungen geknüpft, die zur Stabilisierung des Moleküls beitragen. Inkubiert man LDH in Puffer mit hoher Ionenstärke, so dissoziiert LDH in seine vier Untereinheiten, da die Quartärstruktur durch die elektrostatischen Wechselwirkungen der heteropolaren Ionenbindungen aufrechterhalten wird. Diese Dissoziation tritt auch ein, sobald SDS in einem Verhältnis größer als 1,4g SDS/g LDH mit LDH inkubiert wird. Die negativen Ladungen der Sulfatgruppe überwiegen dann die oben genannten heteropolaren Bindungen.

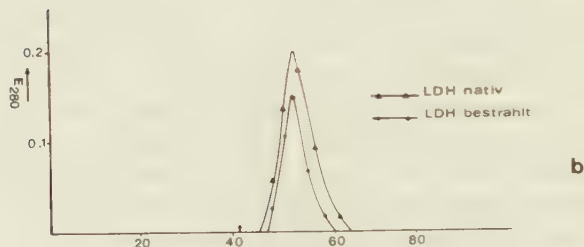
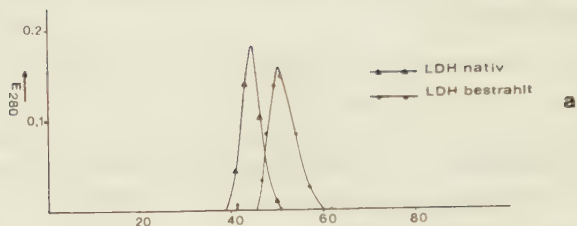


Abb.:8 Auftrennung des tetrameren Peaks von Abb. 5 über G-200.

- a) SDS: LDH = 0,2g/g
 Aufgetragen wurden 10ml
 Puffer: 0,01 M Na - Phosphat, $6,5 \cdot 10^4$ M
 SDS pH: 7,0
 Enzymkonzentration: $\sim 420 \mu\text{g/ml}$
- b) SDS: LDH = 1,4g/g
 Aufgetragen wurden 10ml
 Elutionspuffer: 0,01 M Na - Phosphat,
 $2 \cdot 10^{-3}$ M SDS
 Enzymkonzentration: $400 \mu\text{g/ml}$
 Der Pfeil zeigt jeweil V_0 an.

Abb. 8b zeigt das Elutionsverhalten bei einem Verhältnis 1,4g SDS/g LDH. Hierbei verhalten sich natives Enzym und Moleküle des tetrameren bestrahlten Peaks gleich. Ve liegt bei beiden bei Fraktion 54. Es kommt nicht nur zur Entfaltung sondern auch noch zur Dissoziation. Eichhorn konnte zeigen, daß beim nativen Enzym unter den genannten Bedingungen hier die enzymatische inaktive Untereinheit vorliegt. Auch in dem bestrahlten Peak war keine Aktivität mehr. Die entfaltete Untereinheit ist etwas größer als das native tetramere Enzym, das mit maximaler Konzentration der Fraktion 58 eluiert wird. Das Ergebnis stimmt auch mit der in der Literatur angegebenen Größe für beide Molekülformen überein: natives LDH soll etwa $50 \text{ \AA} \times 120 \text{ \AA}$ groß sein, während die entfaltete Untereinheit $17,3 \text{ \AA} \times 160 \text{ \AA}$ groß sein soll. (31,32)

3.6.2. Verlust der enzymatischen Aktivität nach Zusatz von SDS

Die enzymatische Aktivität von nativer LDH erweist sich gegenüber Zusatz von SDS als sehr empfindlich wie die von Eichhorn gemessene Kurve (Abb. 9c) zeigt. Bestrahlte LDH wurde mit SDS in ansteigendem Konzentrationsverhältnis bei 25°C inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde sofort, 20 Minuten, 1 Stunde und 24 Stunden nach der Inkubation gemessen.

Abb. 9a zeigt den Aktivitätsverlust sofort nach der Inkubation, Abb. 9b den Aktivitätsverlust nach 20minütiger Inkubation. Nach Inkubation von 1 Stunde bzw 24 Stunden konnte keine weitere Aktivitätsänderung mehr festgestellt werden gegenüber der Aktivität bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten.

Gegenüber nativer LDH zeigt sich ein geringerer relativer Aktivitätsverlust durch die Zugabe von SDS. Ursache dafür können die unter 3.6.1. genannten Gründe der verminderten Bildung von LDH-SDS-Micellen oder die Stabilisierung des Enzyms durch neue Bindungen sein.

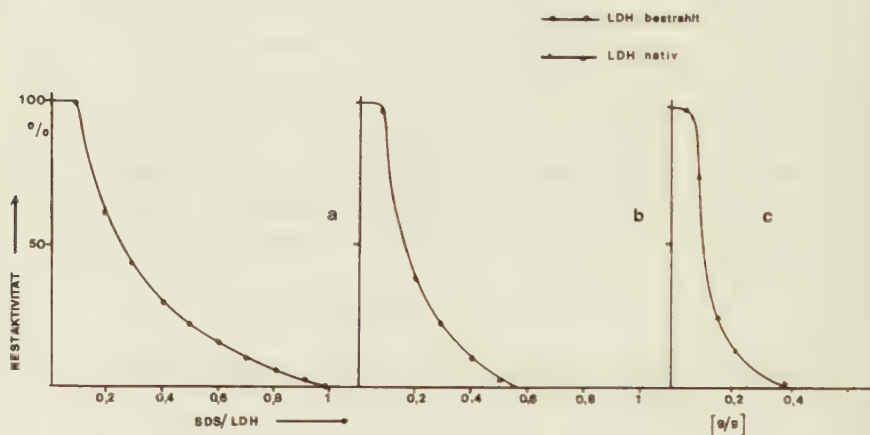


Abb.9 Abhängigkeit nativer und bestrahlter LDH von der Zugabe von SDS (g SDS/g LDH)

a) Inkubationszeit ~ 30 sec

b) Inkubationszeit 20min

Dosis: 200 krd

Puffer: 0,01 M Na - Phosphat

c) native LDH, beliebige Inkubationszeit (11)

3.6.3. Gelchromatographie nach Reduzieren des bestrahlten Enzyms

Fish et al. (29) zeigten, daß S-S-Brücken eine Entfaltung durch SDS behindern. Native LDH besitzt keine S-S-Brücken, wohl aber 16 SH-Gruppen. Müller (33) und Kunigk (10) haben gezeigt, daß sich S-S-Brücken bei der Bestrahlung von LDH bilden. Niemczyk (12) zeigte, daß S-S-Brücken im Aggregationspeak keinen nennenswerten Beitrag zur Stabilisierung des Aggregats bilden.

So lag die Frage nahe, ob sich im tetrameren Peak S-S-Brücken befänden. Der tetramere Peak bestrahlter LDH wurde mit 1% Mercaptoäthanol 2 Std. bei 36°C inkubiert.

Ohne Zusatz von SDS fiel während der Inkubation das Protein aus. Nach Zusatz von SDS im Verhältnis von 1,4 g SDS / g LDH blieb das reduzierte Protein in Lösung. Es wurde anschließend über G-200 (195 cm x 1,4 cm) in 0,01 M Na-Phosphatpuffer + 2 mM SDS eluiert.

Abb. 10 zeigt das Elutionsdiagramm. Die Moleküle müssen wesentlich kleiner als die der nativen LDH sein. Es müssen somit Peptidbrüche in der Kette von bestrahlter LDH vorkommen, die durch S-S-Brückenbildung kompensiert werden.

Niemczyk fand bei der Auftrennung an fast der gleichen Stelle einen Peak, wenn er das Aggregat mit SDS versetzte im Verhältnis 1,8 g SDS / g LDH.

Das gleiche Chromatogram wie in Abb. 10 erhält man, wenn man an Stelle des SDS-Zusatzes die Enzymprobe in 1 M Na Cl Puffer inkubiert, anschließend reduziert und in 0,1 M Na-Phosphat + 1 M Na Cl - Puffer eluiert.

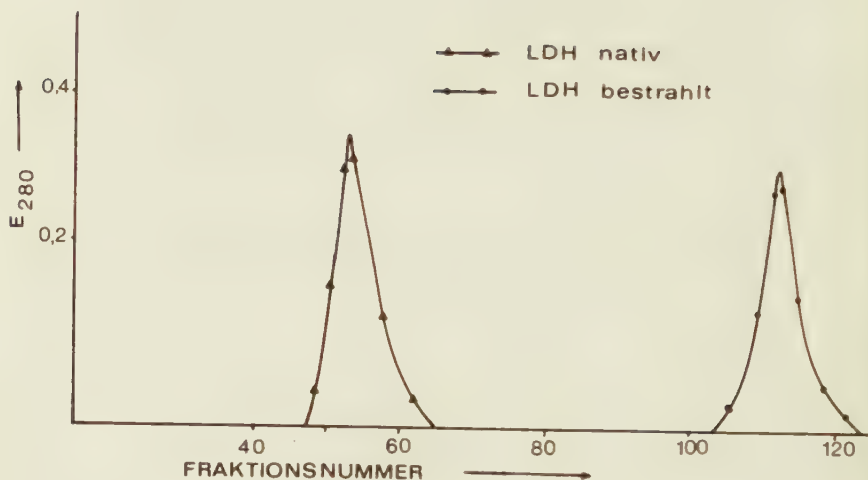


Abb.:10 Auftrennung des tetrameren Peaks von Abb 9 nach Reaktion mit 1% Mercapto-äthanol.

Dosis: 200krd

Elutionspuffer: 0,01 M Na - Phosphat-
puffer pH 7,0
+ 2m M SDS

Zum Vergleich wurde native LDH unter
gleichen Bedingungen aufgetrennt.

3.6.4. Gelfiltration Über G-10.

Da es sich bei den in 3.6.3. gefundenen Bruchstücken um Peptide mit einem Molekulargewicht der Größenordnung von 1000 handelt, sollte eine Auftrennung dieser Peptide über G-10 noch eine genauere Bestimmung bringen. Als Puffer wurde 0,2 M Essigsäure + 0,05 M Ammoniumacetat verwendet. Dieser Puffer wurde aus zwei Gründen gewählt:

1. Für die anschließende Aminosäure-Analyse braucht man einen im Vakuum flüchtigen Puffer
2. Die hohe Ionenstärke soll eine eventuelle elektrostatische Bindung zwischen den Bruchstücken vermindern.

Abb. 11 zeigt die Auftrennung der reduzierten mit SDS versetzten Enzymprobe über G-10. Die Auftrennung wurde bei 2 Wellenlängen gemessen, weil es möglich wäre, daß die Peptide aus Ketten mit aromatischen und aus Ketten ohne aromatische AS bestünden.

Erstere absorbieren bei $\lambda = 236\text{nm}$ und $\lambda = 280\text{nm}$, letztere nur bei $\lambda = 236\text{nm}$ (34,35). Unter diesen Bedingungen trennt sich die Enzymprobe in 2 Peaks auf. Der bei $\lambda = 236\text{nm}$ gemessene positive Peak II stellt das Mercaptoäthanol dar, der negative Peak den Na - Phosphatpuffer. Das SDS konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei der Auftrennung des in Anwesenheit von 1 M NaCl reduzierten Enzyms ergab sich ein Elutionsdiagramm, wie es in Abbildung 12 zu sehen ist: der erste Peak mit dem Maximum bei Fraktion 44 fällt nun weg und der zweite Peak erscheint 5 Fraktionen früher. Diese Verschiebung des Peaks liegt nahe dem Bereich der Fehlergrenze der Trennleistung der Säule. Das unterschiedliche Ergebnis von Abb. 11 und Abb. 12 dürfte wohl darauf beruhen, daß SDS eine Molekülart noch zu entfalten vermag, oder daß SDS noch vorhandene hydrophobe Wechselwirkungen aufzuheben vermag.

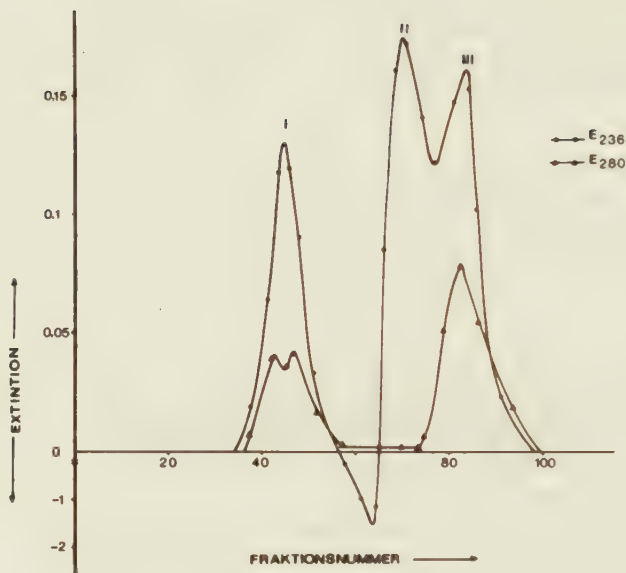


Abb.:11 Auftrennung des tetrameren Peaks von
Abb. 5 nach Reduzieren und Inkubieren
mit SDS über G-10

—●—●—● = 236 nm

—▲—▲—▲ = 280 nm

Elutionspuffer: 0,2 M Essigsäure + 0,05
Ammoniumacetat

Dosis: 200 krd

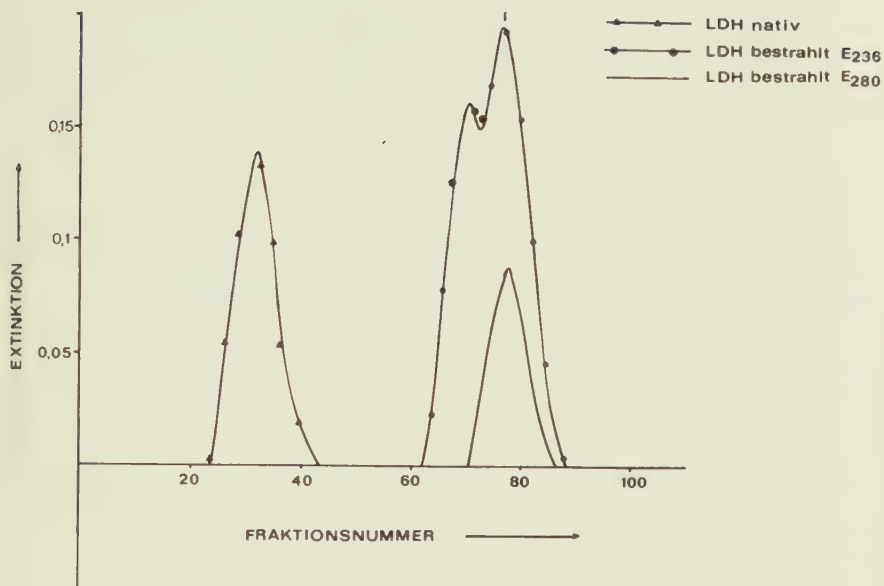


Abb.:12 Auftrennung des tetrameren Peaks von
Abb. 5 nach Reduzieren und Inkubieren
mit 1 M Na Cl

—●—●—●: $\lambda = 236 \text{ nm}$

—: $\lambda = 280 \text{ nm}$

Elutionspuffer: 0,2 Essigsäure + 0,05
Ammoniumacetat

Dosis: 200 krd

▲▲▲ = Verhalten von nativer LDH
bei $\lambda = 280 \text{ nm}$

3.7. Molekulargewichtsabschätzung der Bruchstücke

Die Gelfiltration kann zur Molekulargewichtsbestimmung herangezogen werden, wenn die Proteine die gleiche Konformation besitzen. Durch Vergleich mit Standardsubstanzen bekannten Molekulargewichts kann dann das Molekulargewicht abgeschätzt werden. Die Voraussetzung der gleichen Konformation wird erreicht, indem man die Proteine reduziert und in Gegenwart von denaturierenden Agentien eluiert. Diese beiden Bedingungen bringen eine maximale Entfaltung des Moleküls; es liegt nicht mehr als Zufallsknäuel (random coil) vor, sondern als stäbchenförmiges Gebilde. Dadurch wird der Stoke'sche Radius vergrößert, der das Elutionsverhalten der Moleküle steuert. (26, 28, 29, 30).

Als Standardsubstanzen wurden RSA, Eialbumin und Myoglobin verwendet. RSA und Eialbumin wurden vor dem Auftragen reduziert.

RSA neigt zur Dimerisierung über intermolekulare Disulfidbrücken (36). Dies war auch bei der vorliegenden Arbeit der Fall, da die reduzierten SH-Gruppen nicht durch Alkylierung blockiert wurden und das Reduktionsmittel Mercaptoäthanol während der Gelfiltration von Protein abgetrennt wurde. Eichhorn und Niemczyk (11, 12) fanden auch die dimere Form. Abb. 13 zeigt die Eichgerade und die daraus gefundenen Werte.

Die Eichgerade schneidet die Ordinate bei einem Molekulargewicht von etwa 150 000. Protein-SDS-Micellen, die größer als MG 150 000 werden im Ausschlußvolumen eluiert. Nach Angaben der Herstellerfirma trennt G-200 globuläre Proteine von MG 500 bis MG 800 000 (37). Determann grenzt den Fraktionsbereich auf 10 000 - 300 000 ein (20). Nach ihm sind die Eichkurven an ihren Enden gekrümmt. Der Punkt A, der den Peak aus Abb. 10 repräsentiert, liegt in diesem Bereich. Daraus ergibt sich, daß die MG-Bestimmung für diesen Punkt nur orientierenden Charakter hat.

Der Punkt B repräsentiert das nicht reduzierte Protein des Peak I aus Abb. 5. Natives LDH erscheint an der gleichen Stelle, wenn es nicht denaturierenden Bedingungen unterworfen wird. Man erhält ein scheinbares MG von 26 000 ; in Wirklichkeit besitzt LDH aber ein MG von 140 000, wie zuletzt Eichhorn zeigte (11).

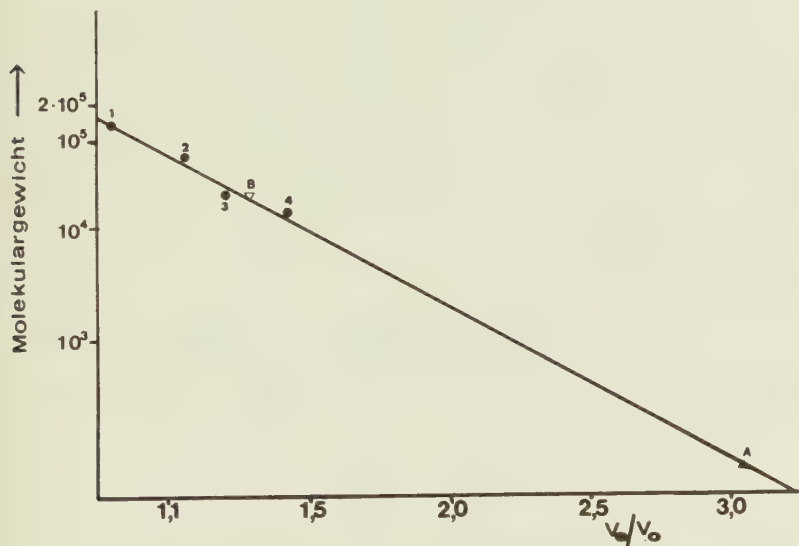


Abb.: 13 Molekulargewichtsbestimmung mit Sephadex G-200, die Eichproteine wurden mit SDS versetzt im Verhältnis 1,4 g SDS / g Protein.

Elutionspuffer: 0,01 M Na-Phosphat + 3 mM SDS

1: Rinderserumalbumin (RSA) dimer:

MG 134 000

2: RSA monomer:

MG 67 000

3: Eialbumin:

MG 45 000

4: Myoglobin:

MG 17 000

A: reduzierter tetramerer Peak I von Abb. 5 =
Peak aus Abb.: 10

B: nicht reduzierter Peak I von Abb. 5
natives LDH

3.8. UV-Differenzspektrum

Die aromatischen Seitenketten der Proteine von den Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin sind dafür verantwortlich, daß Proteine im Bereich von 240 - 320nm absorbieren. Denaturierungsvorgänge lassen sich durch Differenzspektren verfolgen. Scheraga et al. (44) führen die Absorptionsänderung auf Veränderung der Nachbarschaft der aromatischen Gruppen durch Entfaltung zurück. Die chromophoren Gruppen werden dadurch maskiert bzw. demaskiert. Weiterhin beeinflußt das denaturierende Agens den Grundzustand bzw. den angeregten Zustand der Elektronenhülle der chromophoren Gruppen (44). Dadurch wird die Absorption entweder zu den kürzeren Wellenlängen ("blue shift") oder zu den längeren Wellenlängen ("red shift") verschoben (45).

Es wurden 3 Spektren aufgenommen:

Abb. 14a zeigt das Differenzspektrum des tetrameren Peaks von Abb. 5. Die Differenz wurde direkt gemessen gegen native LDH. Im Vergleich zum Spektrum der nativen LDH (4) zeigt sich:

1. eine Verschiebung des Maximums von $\lambda = 250\text{nm}$ bei nativer LDH zu $\lambda = 246\text{nm}$ bei bestrahlter,
2. eine Extinktionsabnahme von $\lambda = 280\text{nm}$ bis $\lambda = 294\text{nm}$.

Diese beiden Phänomene werden in der Literatur mit "denaturierenden blue shift" bezeichnet (38).

Der Kurvenverlauf zwischen $\lambda 280\text{nm}$ und $\lambda 294\text{nm}$ zeigt Dips und Schultern. In der Literatur wurde dies verschieden interpretiert: während Liber et al (38) dies auf eine phenolische Dissoziation der Tyrosinseitenketten zurückführt, meint Scheraga, daß diese Veränderung auf Modifizierung in der Umgebung des Indolrings zurückzuführen seien. Auch die Absorptionserhöhung bei Wellenlängen $\lambda > 300\text{nm}$ wird verschieden interpretiert:

Aktipis und Immartino (54) fanden, daß die Absorption in diesem Wellenlängenbereich auf modifizierte Tyrosinreste beruhe. Sie untersuchten das Enzym Ribonuclease. Nach Weber und Teale (53) ist die Erhöhung der Extinktion durch eine verstärkte Lichtstreuung bedingt. Eine Zugabe von SDS im Verhältnis 1,4 SDS/g Enzym führt in Abb. 14 zu einer Extinktionsabnahme über dem gesamten Bereich. Ein Minimum liegt bei $\lambda = 286\text{nm}$.

SDS-Zugabe scheint den Streulichtanteil zu senken, da ja bei dem vorliegenden Verhältnis die LDH-SDS-Micelle als Untereinheit vorliegt. Es kann aber auch so sein, daß SDS die chromophoren Gruppen in einen Zustand bringt, in dem sie weniger absorbieren.

Abb. 15 zeigt ein Differenzspektrum von nativer LDH, die mit SDS im Verhältnis 1,4 g SDS/g Enzym versetzt wurde. Hierbei liegt das Minimum bei $\lambda = 296\text{nm}$. Bei der mit SDS versetzten bestrahlten tetrameren Probe lag $\lambda = 286\text{nm}$. Es zeigt sich also, daß durch Bestrahlen eine deutliche Verschiebung des Maximums zu den kürzeren Wellenlängen geschieht (= Denaturation "blue shift"). Die absolute Vergrößerung der Differenzwerte läßt darauf schließen, daß SDS auf native LDH mehr Wirkung auszuüben vermag als auf den tetrameren Peak des bestrahlten LDH.

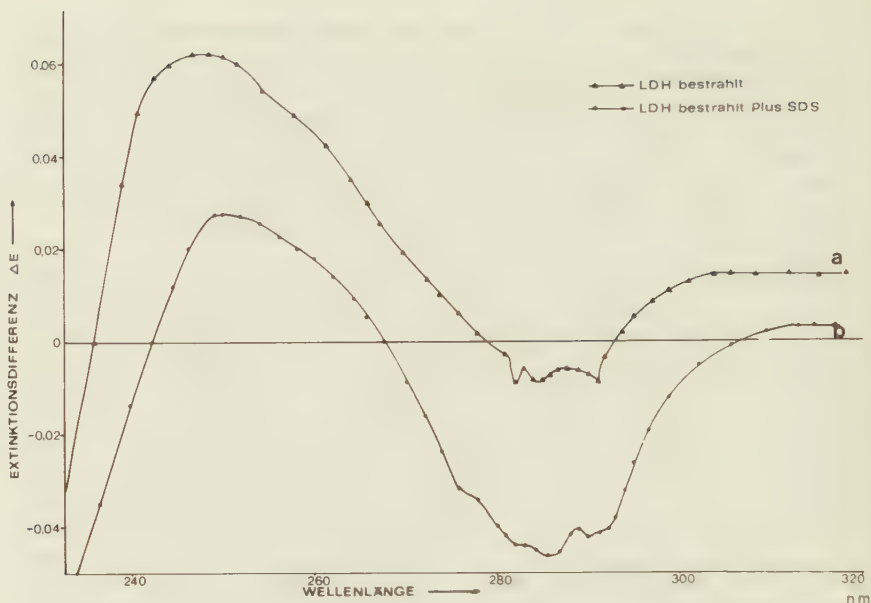


Abb.:14a UV-Differenzspektrum des bestrahlten tetrameren Peaks von Abb. 5 gemessen gegen eine gleichkonzentrierte native LDH-Lösung. ($E_{\text{nat}} = 0$)

Ionenkonzentration: 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Puffer: 0,01 M Na-Phosphat pH 7,0

Dosis: 200 krd

Abb.:14b Differenzspektrum des mit 1,4g SDS/g LDH versetzten tetrameren Peaks von Abb. 5. Sonstige Bedingungen wie Abb. 14a.

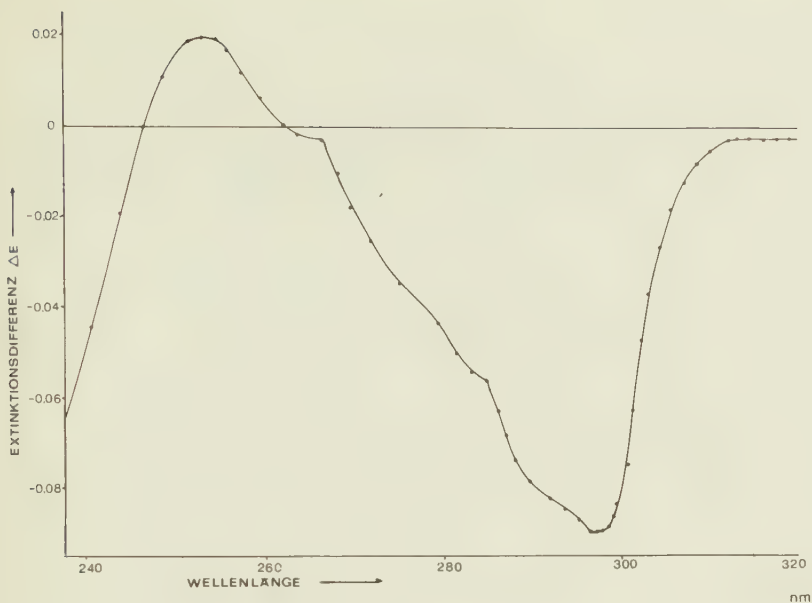


Abb.: 15 UV-Differenzspektrum von nativer LDH gegen durch SDS denaturierte LDH.
Denaturierungsverhältnis: 1,4 g SDS / g LDH
Konzentration: 500 μ g / ml
Puffer: 0,01 M Na-Phosphat pH 7,0

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Bindungen in den tetrameren Molekülen vorliegen, die sich nach der Bestrahlung gelchromatographisch wie native LDH-M₄ Moleküle auswiesen. Die Einwirkung der Strahlen auf das Protein ging hauptsächlich über die Radiolyseprodukte des Wassers: H[•], OH[•], e_{aq}⁻ (9, 51). Da beim Betrachten der Proteinlösung keine Radikalfänger zugesetzt wurden, kamen alle drei Wasserradikale zur Wirkung.

Über das Verhalten von H[•] Radikalen bei der Reaktion mit Biomolekülen gibt es noch keine Messungen. OH[•] Radikale reagieren nach pulsradiolytischen Messungen sehr schnell mit den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Histidin, Phenylalanin, aber auch mit Cystein und Cystin; e_{aq}⁻ reagiert besonders schnell mit Sulfhydryl-, Disulfid- und Imidazolgruppen. Phosphatpuffer reagiert unterschiedlich schnell mit den Wasserradikalen.

Für die Reaktion von e_{aq}⁻ mit LDH in Konkurrenz zur Reaktion von e_{aq}⁻ mit H₂PO₄⁻ läßt sich die Wahrscheinlichkeit der Reaktion des solvatisierten Elektrons mit dem Enzymmolekül nach folgender Gleichung berechnen:

$$w = \frac{k_1 c_1}{k_1 c_1 + k_2 c_2}$$

Dabei sind:

W = Wahrscheinlichkeit der Reaktion des Radikals mit dem Enzym.

k₁ = Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des Radikals mit dem Enzym

k₂ = Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des Radikals mit dem Puffer

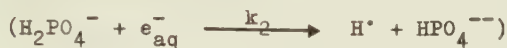
c_1 = Konzentration der Enzymlösung

c_2 = Konzentration der Pufferlösung

Da für die Reaktion der solvatisierten Elektronen beide Geschwindigkeitskonstanten bekannt sind, läßt sich die Wahrscheinlichkeit berechnen.

$$k_1 : 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 : 4,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



$$c_1 : 7 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$c_2 : 1 \times 10^{-1} \text{ M}$$

$$W = \frac{10^{10} \cdot 7 \cdot 10^{-6}}{10^{10} \cdot 7 \cdot 10^{-6} + 4,2 \cdot 10^6 \cdot 10^{-1}} = 0,15$$

d.h. nur 15 % aller gebildeten solvatisierten Elektronen reagieren mit dem Enzym.

Anstelle der solvatisierten Elektronen reagieren somit $H^\cdot$ Radikale mit dem Enzym.

Entsprechende Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion von $H^\cdot$ und $OH^\cdot$ Radikalen mit LDH sind noch nicht bekannt. Bestrahlt man LDH- M_4 Lösungen 1 mg Enzym / ml mit einer Dosis von 196 krd, so erhält man bei einer Restaktivität von 19% eine ausreichende Menge tetramere Bestrahlungsprodukte. Niemczyk erreichte ungefähr die gleiche Restaktivität von 23%. Er bestrahlte bei einer Enzymkonzentration von 3,1 mg/ml mit 400krd. Die gleiche Restaktivität entspricht der Tatsache des "Verdünnungseffektes", der besagt, daß die Veränderung des Moleküls bei gleicher Dosis in verdünnter Lösung größer ist als in konzentrierterer Lösung (39). Dies gilt jedoch nur in einem gewissen Verdünnungsbereich. Denkl, der eine Restaktivität von 20% erhielt, wenn er mit 226 krd eine Lösung von 1mg/ml LDH bestrahlte, benutzte einen Puffer mit höherer Ionenstärke. Seine Ergebnisse sind deshalb nur mit Vorbehalt zu vergleichen.

Die Gelchromatographie der bestrahlten Enzymlösungen über G-200 lieferte drei Gruppen von Molekülen (s. Abb. 5). Alle Peaks besaßen noch noch enzymatische Aktivität. Denkl und Niemczyk fanden noch einen Peak IV ohne Aktivität. In der vorliegenden Arbeit konnte er nur dann gefunden werden, wenn durch Dosiserhöhung der Peak III (Aggregat) in Abb. 5 zunahm. Wie Haskill (16) bei bestrahlter Ribonuclease zeigen konnte, entstehen bei der Bestrahlung Brüche in der Peptidkette. Peak IV könnte solche Bruchstücke enthalten. Er besitzt eine positive Korrelation zu Peak III, d.h. je größer Peak IV desto größer auch Peak III. Peak I besitzt eine negative Korrelation zu Peak III und IV. Auch die Ergebnisse von Niemczyk zeigen eine derartige Korre-

lation von Peak IV mit Peak III.

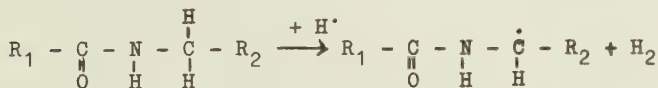
In der vorliegenden Arbeit wurde bestrahlte LDH, die sich in ihrer Molekülgröße nicht von nativer LDH unterschied, genauer untersucht. Durch die Radiolyse können diese Moleküle durch folgende Bindungen verändert sein:

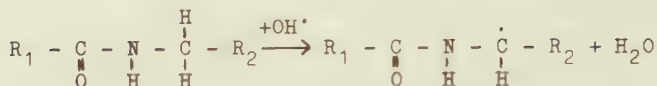
1. Nicht kovalente Bindungen

- a) elektrostatische Bindungen mit einer Bindungsenergie von 10-20kcal/Mol (40). Bei Proteinen bilden diese Bindungen sich aus elektropositiven und elektronegativen Seitenketten der Aminosäuren.
- b) Wasserstoffbrückenbindungen mit der Bindungsenergie von 2-10kcal/Mol (40). Sie bilden sich, wenn ein Sauerstoff- und ein Stickstoffatom weniger als 2,8 Å weit voneinander entfernt sind.
- c) hydrophobe Wechselwirkung zwischen aliphatischen und zyklischen Aminosäureresten.

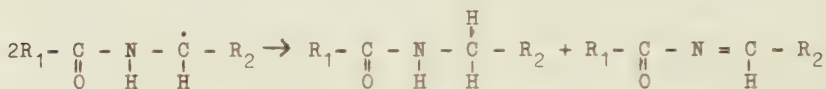
2. Kovalente Bindungen

- a) Neue C - C - Bindungen. Bei der Radiolyse von Ribonuclease konnten Lichtin, Ogden und Stein (15) die Bindung von C α -Radikalen in Proteinmolekülen nachweisen. Über die Bildung von C α -Radikale bei Bestrahlung von kleinen Peptiden berichten Garrison et al (13, 14): nach ihrer Vorstellung entreißen H $\cdot$ und OH $\cdot$ - Radikale dem C α -Atom ein Wasserstoffatom:





Diese Produkte können direkt miteinander reagieren oder eine Disproportionierungsreaktion eingehen:

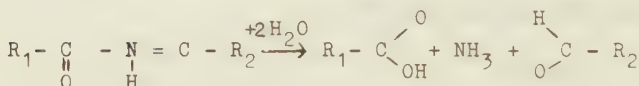


3. Veränderung bei den kovalenten Bindungen

a) Zerstörung von kovalenten Bindungen (Arbeit von Garrison)

Theorie: Durch Disproportionierung des $C\alpha$ -Radikals chemischer Nachweis des Alanins nach Radiolyse des Acetylalanins.

Das neu entstandene Dehydropепtid zerfällt leicht:



Zum Beweis für ihre Theorie geben Garrison et al. an, daß durch die Bestrahlung einer Acetylalaninlösung die freie Aminosäure Alanin freigesetzt zu haben.

b) Bildung von neuen Bindungen

neue C - C durch Reaktion von 2 $\dot{C}$ -Radikalen
neue S - S aus Cystein.

S-S-Brückenbildung aus 2 SH-Gruppen. Kunigk konnte nach der Bestrahlung von LDH eine Neubildung der Aminosäure Cystin finden. Er führte dies darauf zurück, daß während der Bestrahlung 2 Cystinmoleküle durch S-S-Brückenbildung in Cystin übergingen. S-H-Gruppen weisen eine hohe Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion mit $OH^\bullet$ und e_{aq}^- auf (41)

Haskill und Hunt (16) vertreten die Meinung, daß die S-S-Brücken einen wesentlichen Beitrag zur Aggregatbildung bei bestrahlter Ribonuclease bilden.

Um die Bindungsqualitäten im tetrameren Peak zu untersuchen, wurde die Wirkung von Dodecylsulfat auf die Proteinlösung angewandt. Die Wechselwirkung von Protein und SDS war Gegenstand vieler Arbeiten in den letzten Jahren (5, 11, 24, 27, 28, 29). Auf Grund verschiedener Untersuchungsverfahren nimmt man an, daß sich aus den hydrophoben aliphatischen Ketten der SDS-Moleküle und den hydrophoben Seitenketten des Proteins gemischte Micellen bilden (43, 42). Die negativ geladenen Sulfatgruppen der SDS-Moleküle stoßen sich einander ab und entfalten so die Protein-SDS-Micelle und heben elektrostatische und apolare Bindungen auf (44).

Viele Arbeiten zeigten, daß das Bindungsverhältnis für viele reduzierte Proteine auf einer Gramm-zu-Gramm-Basis identisch ist. Zwischen 5 und $8 \cdot 10^{-4}$ M monomeres SDS gibt es einen gesättigten Komplex von 0,4g SDS/g Protein; oberhalb $8 \cdot 10^{-4}$ M freies SDS erhält man einen zweiten Komplex von 1,4g SDS/g Protein. Dabei geht man von der Vorstellung aus, daß sich das Proteinmolekül aus der Ellipsoid-Form im nativen Zustand immer stärker entfaltet durch Vergrößerung der langen Achse des Ellipsoid, während die kleine Achse konstant bleibt (28). Vom nativen "random coils" gelangt das Molekül so in die Stäbchenform.

Eichhorn fand bei einem Verhältnis von 0,2g SDS/g Protein eine Entfaltung der nativen LDH. Unter den gleichen Bedingungen verhielt sich das tetramere Enzym anders. Bei der Gelchromatographie wandert der Peak unter diesen Bedingungen nicht bis zum Ausschlußvolumen (d.h. 16 Frakt.), sondern nur 9 Fraktionen. Entweder lagern sich nicht so viele SDS-Moleküle an das tetramere LDH-Molekül an oder das tetramere Molekül ist durch neue kovalente Bindungen so stabilisiert, daß es sich nicht so stark entfalten kann.

Bei einem Verhältnis von 1,4g SDS/g Protein, bei dem alle nicht kovalenten Bindungen aufgehoben werden (s. Abb. 8b), verhalten sich Moleküle der nativen LDH und Moleküle des tetrameren Peaks wieder gleich: sie werden entfaltet und - wie Eichhorn für die native LDH zeigen konnte - dissoziieren in die monomere Untereinheit. Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß bei der Bestrahlung innerhalb der monomeren Untereinheit neue Bindungen entstehen aber intermolekular d.h. zwischen zwei monomeren Untereinheiten keine neuen Bindungen entstehen.

Das LDH-Molekül wird als Rotationsellipsoid aus vier gleichen Untereinheiten beschrieben. Da die Radikale die Peptidbindungen der LDH von der Peripherie her angreifen, sind Interaktionen zwischen den Untereinheiten kaum zu erwarten.

Mit den Ergebnissen der Gelchromatographie korrespondieren auch die Ergebnisse der Aktivitätsabnahme des nativen und bestrahlten Enzyms nach Zugabe von SDS (s. Abb. 9). Eichhorn fand bei einem Verhältnis von 0,2g SDS/g Protein eine Restaktivität von 14%. Bei den Molekülen des tetrameren Peaks waren es aber noch 52% (nach 30sec.) bzw 42% (nach 24Std.). Während bei nativer LDH die Aktivität bei einem g/g Verhältnis von 0,4g SDS/g LDH-M₄ erlosch, wurde beim tetrameren Molekül erst bei einem Verhältnis von 0,6g SDS/g LDH keine enzymatische Aktivität mehr gemessen. Da die Aktivität des Enzyms im wesentlichen durch die Integrität der Struktur bestimmt wird, müssen demnach durch die Bestrahlung Bedingungen entstanden sein, die das tetramere Molekül stabilisieren. Chromatographieläufe unter verschiedenen Bindungen (s. Abb. 3, 6) zeigen, daß im tetrameren Peak die Moleküle nicht nur durch elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert werden.

Auch die Ergebnisse der UV-Differenzspektren sprechen

dafür, daß native LDH mehr Veränderung durch Zugabe von SDS erfährt, als der tetramere Peak (s. Abb. 14, 15). Erst die Reduktion mit Mercaptoäthanol zeigte, daß radiolytisch entstandene S-S-Brücken die Moleküle des tetrameren Peaks stabilisieren. Nach der Reduktion wurden Moleküle in der Größenordnung von ca 1000 (MG) gefunden. Diese Befunde sprechen dafür, daß an der LDH in einem beträchtlichen Ausmaß Spaltungen der Peptidkette vorkommen. Diese Peptidbrüche sind aber durch S-S-Brückenbildung maskiert. Das Phänomen der maskierten Peptidbrücken wird auch in der Literatur behandelt. Hamilton, Alexander und Hayden et al (45) sprechen von der Möglichkeit maskierter Peptidbrücken bei der Bestrahlung von globulären Proteinen. Offen bleibt bei ihnen die Frage, ob die intramolekularen Brücken, die das Molekül stabilisieren, schon vor der Bestrahlung bestanden oder nicht. Ray und Hutchinson (46) sprechen davon, daß globuläre Proteine eine Tendenz zur reparativen Vereinigung der Bruchstücke haben. Eine solche reparative Vereinigung scheint bei der Radiolyse der LDH durch Bildung der S-S-Brücken abgelaufen zu sein. Mehrere Autoren fanden bei der Bestrahlung von LDH auch Veränderungen der Primärstruktur des Enzyms (4, 10, 12, 47) Kunigk und Niemczyk fanden eine Neubildung von Cystin nach der Radiolyse von LDH-M₄. Niemczyk konnte darüberhinaus zeigen, daß eine minimale Anzahl von S-S-Brücken zur Stabilisierung des Aggregats beiträgt. Unsere Ergebnisse lassen aber auf eine hohe Anzahl von S-S-Brücken im tetrameren Peak schließen. Dies legt den Schluß nahe, daß bei der Radiolyse der LDH zwei Schritte hintereinander ablaufen:

1. eine Bildung von tetrameren Enzymen mit hohem Anteil an S-S-Brücken,
2. eine Bildung von Aggregat mit geringem Anteil an S-S-Brücken.

Pulsradiolytische Messungen (41) haben gezeigt, daß solvatisierte Elektronen und $\text{OH}^\bullet$ -Radikale besonders schnell mit schwefelhaltigen Aminosäuren reagieren. Da unter unseren Bedingungen genügend $\text{H}^\bullet$ - und $\text{OH}^\bullet$ -Radikale gebildet wurden, ist eine Reaktion mit der S-H-Gruppe möglich. Ein weiteres Indiz für einen zweizeitigen Ablauf der Radiolyse bildet die Tatsache, daß mit steigender Dosis, bei sonst gleichen Bedingungen, die Ausbeute an Aggregat zu Ungunsten des tetrameren Enzyms zunimmt (4,11,12).

H. Schüßler (39) konnte zeigen, daß bei der Radiolyse von Ribonuclease, die schon im nativen Zustand die Aminosäure Cystin besitzt, sowohl im Aggregat wie im monomeren Peak, der dem tetrameren Peak bei bestrahlter LDH entspricht, 30% des Cystins abgebaut wurden.

Nach dem gesagten müßte bei der Aminosäurenanalyse eine signifikante Steigerung der Cystinwerte auftreten. Die AS-Analysen lassen aber aus den unter 2.2.8. dargelegten Gründen keine eindeutige Aussage zu.

Bei der Auftrennung des reduzierten tetrameren Peaks von Abb. 5 über G-200 wurde eine einheitliche Molekülgröße von ca 1000 (MG) gefunden. Die weitere Auftrennung geschah über G-10. Die Moleküle hätten demnach im Ausschlußvolumen eluiert werden müssen. Dies geschah aber nicht. Als Gründe dafür können die Gelmatrix und evtl. der Puffer in Frage.

In einer neuen Arbeit haben Lovell und Winzer (48) gezeigt, daß für die Aufrechterhaltung der enzymatischen, aktiven Form von LDH unbedingt Phosphat bzw. NAD^+ oder NADH_2 notwendig ist. Bei Acetatpuffer fanden sie die dimere Form und nur 90% der ursprünglichen Aktivität. Demnach können evtl. auch Bruchstücke ein anderes Elutionsvolumen haben, wenn im Puffer Phosphat fehlt.

Die stark vernetzten Dextrangele G 25, G 15, G 10 haben einige terminale Carboxylgruppen (37). Bei Pufferstärken $< 0,01$ M wirken diese Gruppen als Ionenaustauscher. Sie verzögern Kationen und eluieren Anionen beschleunigt. Dieser Effekt dürfte in der vorliegenden Arbeit keine Auswirkungen gehabt haben.

Mehr Bedeutung dürfte die Affinität dieser Dextrangele zu aromatischen und pseudoaromatischen Proteingruppen haben, wie beschrieben wurde (49 - 51). Diesen Autoren zufolge bilden sich Adsorptionsphänomene zwischen den π Elektronen der aromatischen Gruppen und den π Elektronen des Gels, die die Trennung nach räumlicher Ausdehnung überspielen können.

wurde auf eine Sephadex G-10 Säule eine reduzierte tetramere Enzymlösung aufgetragen, die mit SDS im Verhältnis 1,4 g SDS / g Protein versetzt war, so erhielt man 2 Peaks (Peak I und III in Abb.11). Inkubierte man anstelle von SDS in 1 M Na Cl - Puffer, so erhielt man einen Peak (Peak I in Abb. 12), der mit dem Peak III von Abb.11 identisch zu sein scheint.

Hierfür gibt es folgende Erklärung:

Der reduzierte tetramere Peak aus Abb.: 10 besteht aus zwei Molekülgruppen, die durch nicht kovalente Bindungen zusammengehalten werden. SDS vermag diese Bindungen aufzuheben und eventuell die Bruchstücke zu entfalten. Über die Molekülgröße in den einzelnen Peaks läßt sich keine Aussage machen, da die Trennung nach sterischem Verhalten mit der Trennung nach Adsorptionsverhalten auf einer G-10 Säule miteinander konkurrieren.

5. Zusammenfassung

LDH-M₄ wurde in wässriger Lösung unter N₂ einer Röntgenbestrahlung ausgesetzt. Die entstandenen Produkte wurden über Sephadex G-200 gefiltriert. Es konnten drei enzymatische aktive Molekülgruppen isoliert werden. Der Peak, der sich bei dieser Auftrennung wie native LDH-M₄ verhielt, wurde näher untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß diese Moleküle sich unter dem denaturierenden Einfluß von SDS nicht so leicht entfalten ließen wie native LDH. Aktivitätsvergleich und UV-Differenzspektren nach Zusatz von SDS zeigten auch eine vermehrte Resistenz gegenüber der denaturierenden Wirkung von SDS. Diese Resistenz beruht wahrscheinlich auf S-S-Brücken, die während der Radiolyse gebildet werden. Nach Reduktion der S-S-Brücken mit Mercaptoäthanol wurden Bruchstücke vom Molekulargewicht der Größenordnung 1000 gefunden. Sie sind für multiple Peptidbrüche beweisend. Diese Bruchstücke konnten mit SDS noch einmal in zwei Untergruppen aufgetrennt werden. Die Befunde legen einen zweistufigen Abbau des nativen Moleküls nahe:

1. Bildung von tetrameren Enzym mit viel S-S-Brücken.
2. Bildung von Aggregat mit wenig S-S-Brücken.

6. Literatur

1. Adams, M.J.,
G.C. Ford et al: 'Nature 227, 1098 (1970).
2. Wieland, Th.,
G. Pfeleiderer: Angew. Chemie 74, 261 (1962).
3. Vesell, E.S.,
P.J. Frik, White: Biochim. Biophys. Acta, 159, 236 (1968).
4. Denkl, C.P.: Dissertation, Erlangen (1971).
5. Di Sabato, G.,
A. Pesce, Kaplan: Biochim. Biophys. Acta, 77, 135 (1963).
6. Jaenicke, R.,
S. Knopf: European, J. Biochem. 4, 157 (1968).
7. Jaenicke, R.: Biochim. Biophys. Acta, 85, 186 (1964).
8. Schüßler, H.: Biophysik, 2, 315 (1973).
9. Dertinger, H.
H. Jung: "Molekulare Strahlenbiologie",
Berlin, Springer Verlag (1969).
10. Kunigk, K.: Dissertation, Erlangen (1973).
11. Eichhorn, M.: Dissertation, Erlangen (1973).
12. Niemczyk, P.: Dissertation, Erlangen (1974).
13. Rodgers, M.A.J.,
H.A. So l,
W.M. Garrison: J. Amer. Chem. Soc., 90, 795 (1968).
14. Garrison, W.M.,
B.M. Weeks: Radiat. Res., 13, 214 (1960).
15. Lichtin, N.N.,
J. Ogdan,
F. Stein: Biochim. Biophys. Acta, 276, 124 (1972).

16. Haskill, J.S.,
J.W. Hunt: Radiat. Res. 32, 827 (1967).
17. Wieland, T.,
G. Pfeleiderer,
J. Haupt,
W. Wörner: Biochem. Z., 332, 1 (1959).
18. Warburg, O.,
W. Christian: Biochem. Z. 286, 81 (1936).
19. Bergmeyer, H.U.: "Methoden der enzymatischen
Analyse" Bd. I, Weinheim/
Bergstraße (1970).
20. Determann, H.: "Gelchromatographie", Berlin
(1967).
21. Whitaker, J.R.: Analyt. Chem. 35, 1950 (1963).
22. Jaenicke, R.: Private Mitteilungen, noch nicht
veröffentlicht.
23. Spackmann, D.H.,
W.H. Stein,
S. Moore: Analyt. Chem. 30, 1190 (1958).
24. Nelson, C.A.: J. biol. Chem. 246, 3895 (1971).
25. Black, E.D.,
E. Hayon: J. Phys. Chem. 74, 3199 (1970).
26. Reynolds, J.A.,
C. Tanford: Proceed. Nat. Acad. Sciences 66,
1002 (1970).
27. Di Sabato, G.,
N.O. Kaplan: J. biol. Chem. 239, 438 (1964).
28. Reynolds J.A.,
C. Tanford: J. biol. Chem. 245, 5161 (1970).
29. Fish, W.W.,
J.A. Reynolds,
C. Tanford: J. biol. Chem. 245, 5166 (1970).

30. Pitt-Rivers, R.,
F.J.A. Impiombato: Biochem. J., 109, 825 (1968).
31. Fondy, T.P.,
J. Everse,
G.A. Driscoll,
F. Castillo,
F.E. Stolzenbach,
N.O. Kaplan: J. biol. Chem., 240, 4219 (1965).
32. Pfeleiderer, G.,
D. Jeckel,
K. Mella: "Pyridine Nucleotide-Dependent
Dehydrogenases, Springer Verlag,
Heidelberg-New York, 145 (1970).
33. Müller, E.,
Dissertation, Erlangen (1973).
34. Donovan, J.W.,
M. Laskowski, jr.,
H.A. Scheraga: "Protein Struktüre", New York-
London, Academie Press (1961).
35. Scheraga, H.A. in: J. Amer. Chem. Soc. 83, 2686
(1961).
36. Ferster, J. F.,
in: Putnam: "The Plasma Proteins", Bd. I,
Academic Press (1960).
37. Informationsschrift: "Sephadex-Gelfiltration in Theorie
und Praxis", Pharmacia Uppsala
(1969).
38. Libor, S.,
P. Elödi,
Z. Nagy: Biochem. biophys. Acta, 159, 236
(1968).
39. Schüßler, H.: Biophysik 9, 315-324 (1973).
40. Buddecke, E.: "Grundriß der Biochemie", Berlin-
New York (1973).

41. Anbar, M.,
P. Neta: Int. J. Appl. Radiation Isotopes, 18, 493 (1967).
42. Weber, K.
D.J. Kuter: J. Biol. Chem. 264, 4504 (1971).
43. Rogers, K.S.,
S.C. Yusko: J. Biol. Chem. 244, 6690 (1965).
44. Weber, K.,
M. Osborn: J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969).
45. Hayden, G.A.,
S.C. Rogers,
F. Friedberg: Arch. Biochem. Biophys. 113, 247 (1966).
46. Ray, D.K.,
F. Hurchinson: Biochem. biophys. Acta, 147, 357 (1967).
47. Winstaed, J. A.,
T.C. Reece: Radiat, Res. 41, 125 (1970).
48. Lovell, St.J.,
D.J. Winzor: Biochemistry 13, 3527 (1974).
49. Determann, H.,
I. Walter: Nature, 219, 604 (1967).
50. Ziska, P.: J. Chromatogr. 60, 139 (1971).
51. Streffer, C.: "Strahlen-Biochemie", Berlin-Heidelberg-New York (1969).
52. Adams
und Ebert: ziziert nach Schüßler H.
53. Weber G.,
F.W.J. Teale in: "The Proteins", New York (1965).
54. Aktipis, S.,
Immartino: Bio. Biophys. Acta, 278, 239 (1972).
55. Alexander, P.,
Hamilton, L.D.G.: Radiat. Res., 13, 214 (1960).

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Pauly danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung seitens des Institutes.

Frau Dr. H. Schüssler bin ich besonders dankbar für ihre wissenschaftliche Anleitung, ihre praktische Unterstützung und ihren persönlichen Einsatz für diese Arbeit.

Ferner möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern danken, die mir den Besuch der Universität ermöglicht haben.



Lebenslauf

Am 2.2.1941 wurde ich, Matthias Peuten, als Sohn der Eheleute Jakob und Maria Peuten, geb. Birker, in Grefrath bei Krefeld geboren.

Nach Abschluß der Volksschule absolvierte ich eine Weberlehre, die ich Ostern 1958 mit der Facharbeiterprüfung abschloß. Bis 1963 arbeitete ich als Weber und Warenkontrolleur.

Ostern 1963 trat ich in das Abendgymnasium/Ketteler Kolleg in Mainz ein. Dort legte ich 1967 das Abitur ab.

Ich studierte sodann an der Universität Münster Kath. Theologie und Philosophie.

Ab SS 1969 studierte ich an der Universität Erlangen-Nürnberg Zahnmedizin, ab SS 1972 zusätzlich noch Medizin. Am 24. Juli 1974 schloß ich das Zahnmedizinstudium mit dem Staatsexamen ab; das Staatsexamen für das Fach Medizin legte ich am 12. Juli 1976 ab.

Erlangen, im September 1976

Matthias Peter Peuten

Einleitung

Im 1. Teil dieses Buches werden die Grundlagen der Theorie der Differentialgleichungen dargestellt.

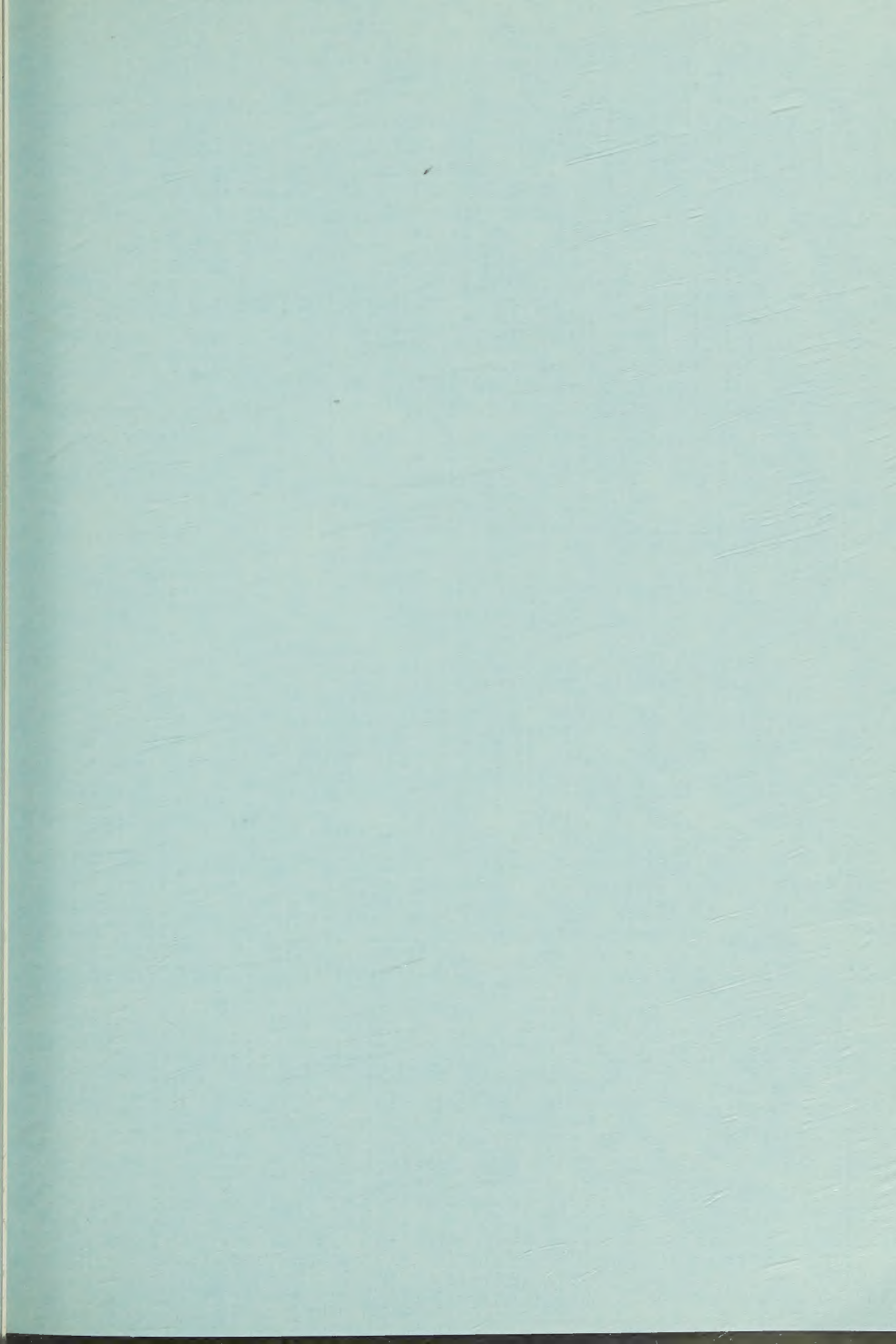
Im 2. Teil werden die Anwendungen der Theorie auf die Physik und die Ingenieurwissenschaften dargestellt.

Im 3. Teil werden die Anwendungen der Theorie auf die Astronomie dargestellt.

Im 4. Teil werden die Anwendungen der Theorie auf die Biologie dargestellt.

Im 5. Teil werden die Anwendungen der Theorie auf die Chemie dargestellt.

Im 6. Teil werden die Anwendungen der Theorie auf die Geologie dargestellt.



Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990